

## Trabajo Fin de Máster

# BÚSQUEDA DE FACTORES QUE MODIFICAN LA PENETRANCIA DE MUTACIONES PATOLÓGICAS EN EL DNA MITOCONDRIAL

Autor/es

Carlos Damián Prieto López

Director/es

Eduardo Ruiz Pesini

María Pilar Bayona Bafaluy

Facultad de Veterinaria

Facultad de ciencias de la universidad de Zaragoza

Año: 2012/13

## Tabla de contenido

---

1	Introducción .....	4
1.1	Mitocondrias y el sistema OXPHOS.....	4
1.2	Sordera asociada a defectos en la síntesis de proteínas del sistema OXPHOS debido a las mutaciones m.1494C>T y m.1555A>G.....	5
1.3	Mecanismo patológico descrito para las mutaciones m.1494C>T y m.1555A>G en presencia de aminoglicósidos .....	5
1.4	Sordera no sindrómica asociada a las mutaciones m.1494C>T y m.1555A>G .....	9
1.5	Proteína MRPS12 como un posible factor clave en la penetrancia de las mutaciones m.1494C>T e m.1555A>G.....	9
1.6	Hipótesis.....	11
1.7	Objetivos .....	11
2	Material y métodos .....	12
2.1	Estudios bioinformáticos.....	12
2.2	Material.....	12
2.2.1	Reactivos .....	12
2.2.2	Kits comerciales.....	13
2.2.3	Plásmidos .....	14
2.2.4	Primers .....	16
2.2.5	Marcadores de pesos moleculares empleados.....	17
2.3	Cultivos celulares.....	17
2.3.1	Cultivos celulares bacterianos.....	17
2.3.2	Cultivos celulares eucariotas .....	19
2.4	Transfección celular .....	21
2.5	Extracción, manipulación y análisis de ácidos nucleicos.....	23
2.5.1	Extracción de RNA total de cultivos celulares en monocapa .....	23
2.5.2	Extracción de DNA nuclear de cultivos celulares en monocapa .....	24
2.5.3	Extracción y purificación de DNA plasmídico .....	24
2.5.4	Purificación de DNA a partir de geles de agarosa .....	24
2.5.5	Cuantificación de DNA.....	25
2.5.6	Secuenciación automática del DNA .....	25
2.6	Programas de PCR empleados .....	25

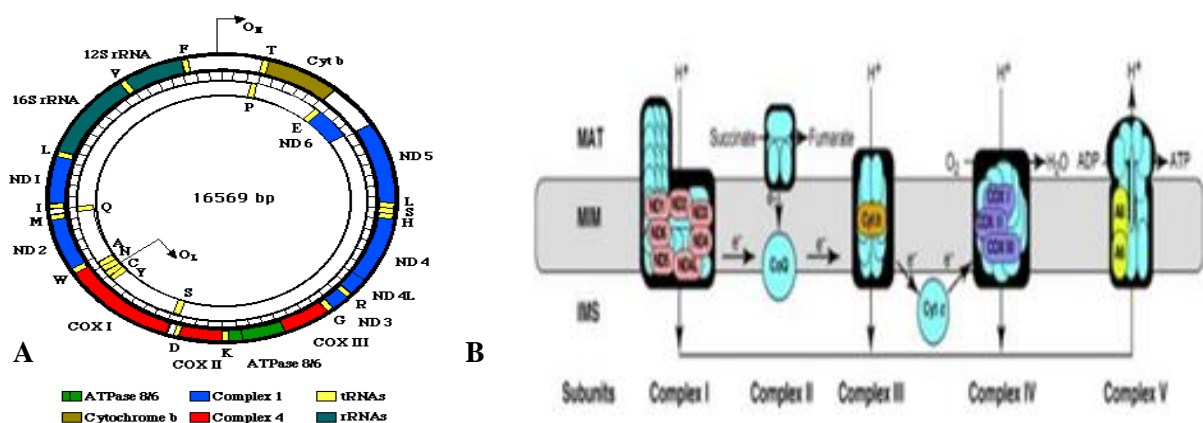
2.6.1	PCR de colonia (PCR de colonia).....	25
2.6.2	Amplificación de DNA por PCR utilizando como molde cDNA .....	26
2.7	Técnicas de manipulación de plásmidos .....	27
2.7.1	Clonación de los productos de PCR en un vector plasmídico .....	27
2.7.2	Mutagénesis dirigida .....	29
2.7.3	Digestión de vectores plasmídicos .....	29
2.7.4	Ligación de un determinado inserto en el vector de elección .....	30
3	Resultados .....	31
3.1	La mutación patológica humana m.1494C>T está fijada en la familia Cercopithecidae 31	
3.2	El nucleótido 1494 es importante para la función del 12SrRNA .....	32
3.3	Una sustitución en la proteína MRPS12:R68L podría compensar la mutación patológica m.1494C>T en macacos.....	33
3.4	Las células Cercopithecidae son resistentes a los aminoglicósidos .....	35
3.5	MRPS12 podría ser un factor modificante que explique la incompleta penetrancia de la mutación patológica humana m.1494C>T y la ausencia del fenotipo patológico en MN... 38	
3.6	Estudio del aminoácido 68 de la proteína MRPS12 como factor que modifica el efecto de la mutación m.1494C>T .....	39
3.1	Perspectivas futuras .....	42
4	Discusión de los resultados .....	43
4.1	MRPS12:68L como posible mutación compensatoria de m.1494C>T .....	43
4.2	Teorías para explicar el origen de la mutación patológica m.1494C>T y su posible mutación compensatoria MRPS12:R68L.....	44
4.3	MRPs como mutaciones compensatorias de otras mutaciones patológicas en el mt- rRNA 46	
5	Conclusiones.....	47
6	Agradecimientos .....	47
7	Bibliografía .....	48

# 1 Introducción

## 1.1 Mitochondrias y el sistema OXPHOS

Las células eucariotas contienen un núcleo, en donde se encuentran los cromosomas heredados de los padres, y muchos otros orgánulos. Entre ellos están las mitocondrias. En la membrana interna mitocondrial se localiza el sistema de fosforilación oxidativa (sistema OXPHOS) que incluye la cadena de transporte de electrones (ETC) o cadena respiratoria y la ATP sintasa. Este sistema lleva a cabo numerosas funciones fundamentales para la célula, como por ejemplo la generación de un gradiente electroquímico en la cual están implicados los 4 complejos respiratorios mitocondriales y la ATP sintasa (Mitchell, P., 1967) para la producción de la mayor parte de la energía celular en la forma de ATP (Wallace, D. C., 2006).

El sistema OXPHOS está compuesto de más de 80 polipéptidos. La mayoría de ellos están codificados en los cromosomas del núcleo (nDNA), son producidos en el citosol y tienen que ser importados al interior mitocondrial. Sin embargo, 13 polipéptidos son codificados en moléculas de DNA que se encuentran en el interior de la mitocondria y que por ello se conocen como DNA mitocondrial (mtDNA). Para la síntesis de estas 13 proteínas, el mtDNA también codifica 22 tRNAs y 2 rRNAs (figura 1) (Wallace, D. C., 2006; Montoya J. et al, 2005; Bindu, L. H. et al, 2008).



**Figura 1. DNA mitocondrial y los complejos que codifica.** A) Esquema del DNA mitocondrial con las subunidades, los rRNAs y los tRNAs que codifica. B) Esquema de las distintas subunidades codificadas por el DNA mitocondrial que forman el sistema OXPHOS.

Así pues, los ribosomas mitocondriales comparten productos codificados en ambos genomas: el nuclear que codifica para las proteínas ribosomales, y el mitocondrial, que codifica los rRNAs (Sylvester J. E. et al, 2004). Los ribosomas mitocondriales están formados por una subunidad grande, que incluye el rRNA 16S y unas 50 proteínas (MRPL, proteínas de la subunidad grande del ribosoma mitocondrial), y una subunidad pequeña, que incluye el rRNA 12S y unas 29 proteínas (MRPS, proteínas de la subunidad pequeña del ribosoma mitocondrial) (Cavdar E. et al, 2001). De esta manera, mutaciones en genes nucleares o mitocondriales pueden provocar alteraciones de la síntesis mitocondrial de proteínas

## **1.2 Sordera asociada a defectos en la síntesis de proteínas del sistema OXPHOS debido a las mutaciones m.1494C>T y m.1555A>G**

Una de las enfermedades debidas a defectos en la síntesis mitocondrial de proteínas es la sordera mitocondrial no sindrómica. En esta enfermedad, las células ciliares de la cóclea son el tejido fundamentalmente afectado. Puede producirse por mutaciones en algunos mt-tRNAs (Zhao et al, 2004; Li et al, 2004) pero es muy frecuentemente causada por dos mutaciones en el rRNA 12S, las transiciones m.1494C>T y la m.1555A>G (Rodríguez-Ballesteros, M. et al, 2006). Lo llamativo de la sordera mitocondrial no sindrómica causada por estas mutaciones es que, con algunas excepciones (del Castillo, F. J. *et al*, 2003), todos los miembros relacionados por vía materna que pertenecen a estos pedigríes portan la mutación en homoplasmia (100% de moléculas mutadas) (Zhao et al, 2004; 2005; Rodríguez-Ballesteros, M. et al, 2006; Bindu, L. H. et al, 2008; Wei, Q. et al 2013; Ding, Y. et al., 2013) y sin embargo unos desarrollan la enfermedad y otros no. Esto probablemente se debe a que otros factores son necesarios para modificar la penetrancia de estas mutaciones (Carelli, V., 2003).

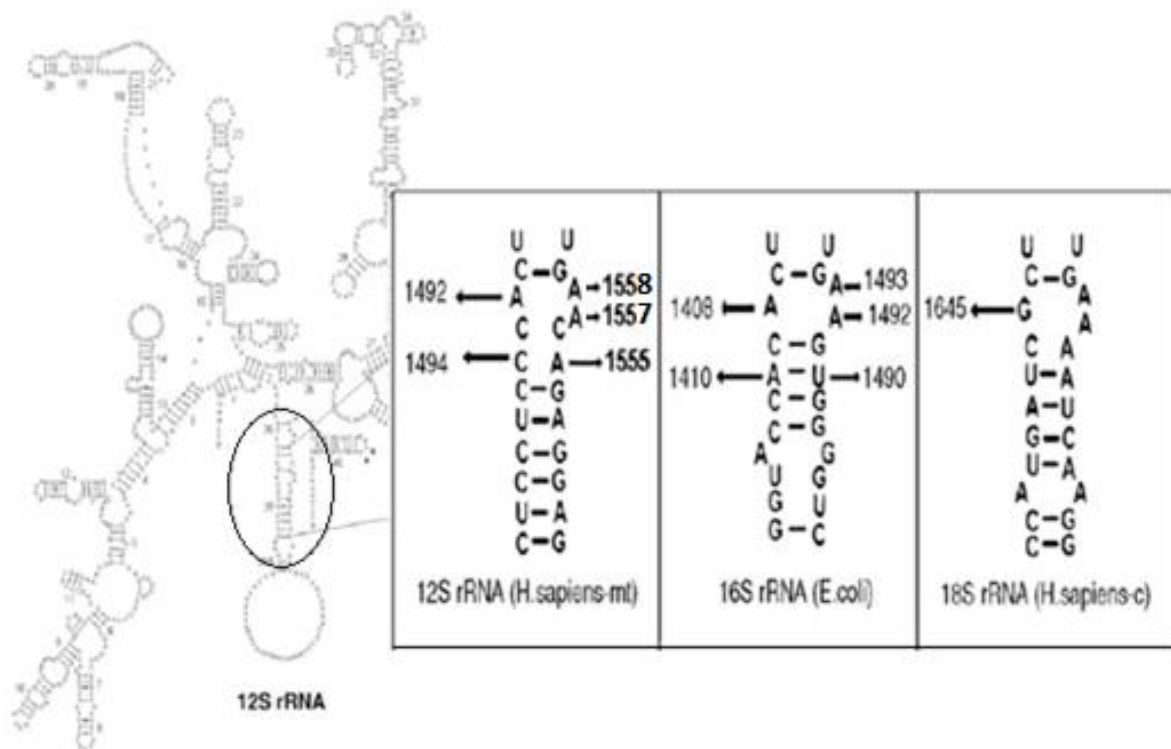
## **1.3 Mecanismo patológico descrito para las mutaciones m.1494C>T y m.1555A>G en presencia de aminoglicósidos**

Ya desde los informes de los primeros pedigríes con la enfermedad, se observó que muchos individuos con la mutación desarrollaban la sordera después de ser expuestos a aminoglicósidos (Zhao et al, 2004; 2005; Rodríguez-Ballesteros, M. et al, 2006; Bindu, L. H. et al, 2008; Wei, Q. et al 2013; Ding, Y. et al., 2013). Estos compuestos son antibióticos que se utilizan para combatir bacterias y actúan a nivel del centro decodificante del ribosoma bacteriano.

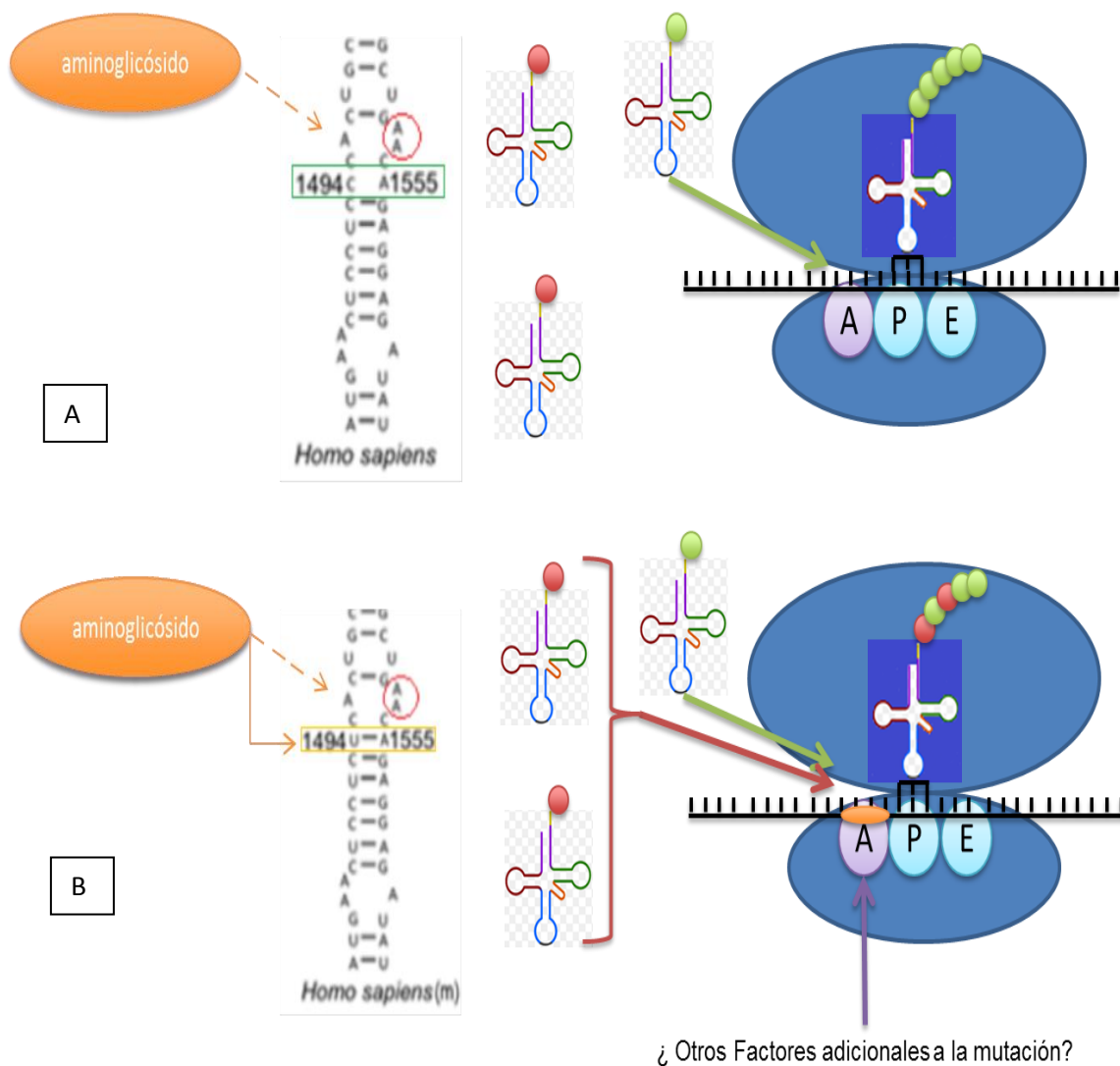
Durante la decodificación, una minihélice se forma entre el codón del mRNA y el anticodon del aminoacil-tRNA relacionado. Dos adeninas conservadas del sitio de decodificación A del ribosoma (en *E coli* son las posiciones Ec.1492A y Ec.1493A mientras que las homologas en mitocondrias de células humanas son m.1557A y m.1558A), que están plegadas hacia afuera en la hélice (estado apagado), son giradas e interaccionan con la minihélice formada por el codón-anticodón relacionado (estado encendido). Este cambio de conformación determina que se continúe con la traducción. Los aminoglicósidos estabilizan el estado encendido aún en ausencia del complejo mRNA-tRNA relacionado, la afinidad de este lugar por tRNAs no relacionados incrementa y no hay una discriminación eficiente, con lo que se producen proteínas con secuencias erróneas (Pacheu-Grau et al, 2010 b).

La selectividad de los aminoglicósidos es ampliamente debida a una posición nucleotídica única en el rRNA. Los citoribosomas son insensibles a los aminoglicósidos por la presencia de una c.1645G. La sensibilidad de los ribosomas procariotas se debe a la presencia de una Ec.1408A (posición homologa a la c.1645 del rRNA 18S eucariota) en el rRNA 16S de *Escherichia coli*, que se corresponde al rRNA 12S mitocondrial (Sven N. Hobbie et al, 2008 a). Las bacterias se vuelven resistentes a los aminoglicósidos mutando esta posición al mismo nucleótido presente en eucariotas.

Análisis filogenéticos detallados de la secuencia de la subunidad pequeña ribosomal mitocondrial indican que las mitocondrias tienen un origen endosimbiótico a partir de un grupo de bacterias llamadas  $\alpha$ -proteobacterias y esto indica que, aunque los ribosomas citosólicos eucariotas son muy distintos a los procariotas, los ribosomas mitocondriales y los bacterianos son bastante similares, lo que se traduce en una similar afinidad por los aminoglicósidos (Pacheu-Grau et al, 2010 a). El rRNA 12S mitocondrial humano tiene una A en la posición equivalente, m.1492A, y es sensible a los aminoglicósidos (figura 2). Las dos mutaciones en el mt-rRNA que han sido asociadas con sordera mitocondrial no sindrómica afectan a posiciones que en bacterias forman un par de bases Watson-Crick (Wcbp) y son importantes para la unión de los aminoglicósidos. El rRNA 12S de tipo salvaje carece de este Wcbp, pero las mutaciones patológicas lo reconstruyen e incrementan su similitud a su homólogo bacteriano (Rodríguez-Ballesteros, M. et al, 2006), incrementando todavía más la unión de los aminoglicósidos con m.1492A y su interacción con las adeninas del sitio de decodificación (Ogle, J. M et al, 2002). (Figura 3).



**Figura2. Representación de 12S rRNA.** En círculo se señala la zona de decodificación A con la diferente numeración de nucleótidos según si el ribosoma es mitocondrial humano, de bacteria E coli o un ribosoma citosólico. Se señala la posición 1492A (mitocondria humana) y 1408A (E coli) como las posiciones homologas a 1645G (ribosoma citosólico). Los aminoglicósidos se unirán a esa posición si hay una adenina. Se señala la posición mitocondrial humana 1494/1555 carente de un Wcbp mientras que la posición homologa de E coli 1410/1490 forma un Wcbp y permite la unión de los aminoglicósidos. Las posiciones 1492 y 1493 de E coli pertenecen a las adeninas del sitio de decodificación. En el caso de la secuencia mitocondrial humana son las posiciones 1557 y 1558.



**Figura 3. Esquema del funcionamiento de la mutación m.1494C>T o la m.1555A>G.** A) Forma silvestre de la zona de decodificación A del ribosoma mitocondrial humano. Los aminoglicósidos tienen afinidad por la adenina de la posición 1492 pero la ausencia de un Wcbp entre las posiciones 1494-1555 dificulta su adhesión al sitio de decodificación y ello permite una correcta selección de tRNA. B) mutación m.1494C>T de la zona de decodificación A del ribosoma mitocondrial humano. El conjunto de Wcbp formado entre las posiciones 1494-1555 junto a m.1492A facilita la adhesión de aminoglicósidos. Los aminoglicósidos interaccionan con las adeninas del sitio de decodificación y estabilizan el estado encendido y por ello no hay una buena discriminación de tRNA. Esto conlleva a una traducción errónea de las proteínas. Hay casos donde no se requiere aminoglicósidos para generar el fenotipo patológico u se requiere de otros posibles factores adicionales.

En círculo rojo se señala las adeninas del sitio de decodificación. En un rectángulo verde se señala la ausencia de Wcbp1494/1555. En rectángulo naranja se señala la presencia de Wcbp1494/1555. Los "tRNAs rojos" son los tRNAs erróneos para un codón dado. Los "tRNAs verdes" es el tRNA correcto para un codón determinado.



#### **1.4 Sordera no sindrómica asociada a las mutaciones m.1494C>T y m.1555A>G**

Hasta ahora se ha explicado el efecto de estas mutaciones con los aminoglicósidos pero se sigue sin saber porque las mutaciones por si solas pueden generar un fenotipo patológico o por qué en los pedigríes analizados hasta la fecha la mutación m.1555A>G genera más fenotipos patológicos que la mutación m.1494C>T. Una explicación plausible podría ser que la interacción C-G (mutación 1555) genera 3 puentes de hidrogeno en la interacción 1494-1555 mientras que la interacción U-A (mutación 1494) solo genera 2. Esto hace que la estructura del sitio de decodificación formada en el primer caso pueda ser menos flexible dificultando el giro de las adeninas del sitio de decodificación A del estado apagado al estado encendido y haciendo más difícil su interacción con la minihélice codón-anticodón. Como consecuencia, se permitiría una selección menos eficaz de los tRNAs y generaría un mayor número de errores en la traducción y con ello un mayor número de proteínas malformadas. Por esta teoría, la mutación 1494 no sería tan severa y se cometerían menos errores en la traducción (Sven N Hobbie et al, 2008 b).

Aunque se dan casos de sordera no sindrómica, los estudios hasta la fecha demuestran que las mutaciones C4194T o la m.1555A>G en general no son definitivas para el desarrollo de la perdida de la capacidad auditiva, pero su asociación con otros factores como factores ambientales, genes nucleares (Zhao, H. et al, 2005; Rodríguez-Ballesteros, M. et al, 2006; Bindu, L. H. et al, 2008) o polimorfismos mitocondriales (Pacheu-Grau et al, 2011; Wei, Q. et al 2013; Ding, Y. et al., 2013), polimorfismos en las proteínas que interaccionan con rRNAs (James E. Sylvester et al, 2004) pueden ser la clave para explicar los distintos grados de penetrancia entre los individuos que padecen dichas mutaciones (Carelli, V., 2003).

#### **1.5 Proteína MRPS12 como un posible factor clave en la penetrancia de las mutaciones m.1494C>T e m.1555A>G**

En estudios previos se vio que la mutación patológica humana m.1555A>G era la forma silvestre de los orangutanes de Bornean y Sumatran ya que ninguno de dichos animales sufría de ningún tipo de sordera sin síndrome aparente. Esto hizo pensar que ciertas especies podrían haber desarrollado sistemas de reparación de mutaciones de tal forma que

las volviesen neutras. El tratamiento de células de orangutan con aminoglicósidos indujo a su apoptosis. Esto sugirió que estos mamíferos, aunque aparentemente hayan arreglado esta mutación y estén exentos de sufrir sordera espontánea, pueden sufrir sordera inducida. Esto último puede deberse a que los aminoglicósidos son un factor muy reciente y por ello, el genoma de los orangutanes apenas ha tenido tiempo para hacer frente a este nuevo evento (Pacheu-Grau et al, 2011).

Las mutaciones compensatorias son un mecanismo de la evolución para el arreglo de mutaciones patológicas en el DNA mediante otra mutación que la anule la patológica y se piensa que este es el mecanismo que está actuando en estas especies de orangutanes. Estas mutaciones compensatorias pueden encontrarse tanto en el gen con la mutación patológica (Konsdrashov et al, 2002) como en las proteínas que interaccionan con el gen o con el producto que codifica. Entre estas mutaciones compensatorias, se encuentran las proteínas ribosomales (RPs) y es probable que jueguen un papel muy importante a la hora de compensar determinadas mutaciones que se encuentren en mtDNA o en nDNA codificantes de rRNAs. Esto da la idea de que los polimorfismos de proteínas ribosomales mitocondriales (MRPs) pueden influir en la penetrancia y expresividad del fenotipo patológico (James E. Sylvester et al, 2004).

Mediante el estudio con diferentes cepas de bacterias albergando mutaciones comprendidas entre la región 1400-1500 y mutaciones en la proteína S12, se comprobó que la región 1400-1500 del rRNA 16S está implicada como el sitio de interacción codón-anticodón y que la proteína S12 interacciona con la región 1409-1491 jugando un papel muy importante en la selección de los tRNAs correctos. También se ve que el sitio de unión de los antibióticos aminoglicósidos estreptomicina y paromomicina está comprendido entre la región 1409-1491 del rRNA 16S y que la proteína S12 interviene en la unión de la paromomicina a dicha región (O'Connor et al, 1991). En otros estudios con bacterias se vio que según el aminoácido que se mutase de la proteína ribosomal S12, se generaba una resistencia a aminoglicósidos de tal forma que evita que haya errores en la lectura del código genético (Vila-Sanjurjo et al, 2007; Agarwal et al, 2011).

Todos estos indicios hacen prever que alguna otra especie podría tener la mutación patológica humana m.1494C>T como la forma silvestre y no sufrir el fenotipo patológico porque la habría compensado. Por otra parte, los resultados obtenidos en investigaciones

con la proteína ribosomal S12 (RPS12) bacteriana podrían ser similares en ribosomas mitocondriales debido a que comparten un origen común y por ello la proteína ribosomal mitocondrial S12 (MRPS12) parece el mejor candidato para empezar la búsqueda de estas mutaciones compensatoria de entre otras posibles MRPs. Además, esta investigación podría ayudar a comprender por qué otras mutaciones patológicas homoplásmicas en humanos tienen una penetrancia incompleta.

## **1.6 Hipótesis**

Dado que los pedigríes con sordera mitocondrial y la mutación en la posición del mtDNA 1494 son casi siempre homoplásmicos, y sin embargo hay individuos relacionados por vía materna afectados y otros sanos, otros factores deben modificar la penetrancia de la mutación.

## **1.7 Objetivos**

Nuestro objetivo principal es la determinación de los factores que modifican la penetrancia de las mutaciones del mtDNA que se hayan comúnmente en homoplasmia. Para ello, nos hemos propuesto dos objetivos parciales que serán el motivo de este trabajo de fin de master:

- 1) Búsqueda de modelos naturales portadores de la mutación mitocondrial m.1494C>T como el alelo de tipo salvaje.
- 2) Estudio de los factores genéticos nucleares que han permitido la fijación de esta mutación patológica en esa especie.

## 2 Material y métodos

---

### 2.1 Estudios bioinformáticos

Se obtuvieron 316 secuencias de MT-RNR1 de mamíferos sacadas de mt-DNAs publicados en Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>). También se recuperaron 24 secuencias totales o parciales de MT-RNR1 de Cercopithecidae de Genbank. 40 secuencias de vertebrados de la proteína MRPS12 fueron obtenidas de Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>). Alineamiento de secuencias fue realizada mediante el programa de alineación de secuencias ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Los índices de conservación fueron estimados como el programa consurf tool (<http://www.consurf.tau.ac.il>) para calcular el índice de conservación tomando en cuenta el árbol filogenético. Para confirmar el origen de las especies de nuestras células, se empleó el programa Basic Local Alignment Search Tool (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). El modelo molecular para ss-rRNA/RPS12 (PDB 2WDG) se obtuvo con el programa RasMol2.6. SNPs non-synonymous de la proteína humana MRSP12 fueron encontrados en dbSNP Home Page (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>).

### 2.2 Material

#### 2.2.1 Reactivos

Todos los reactivos químicos usados en este trabajo fueron de grado analítico o de grado apto para biología molecular y en su caso, aptos para cultivo celular. La mayoría fueron adquiridos en las siguientes casas comerciales: Bio-Rad, Bioron, GE Healthcare, Invitrogen, MERCK, Panreac, Promega Biotech Ibérica, Roche y SIGMA-ALDRICH.

Las enzimas de restricción, así como otras enzimas modificadoras del DNA (fosfatasa alcalina, ligasa, retrotranscriptasa, DNAsa) se obtuvieron de las casas comerciales: New England Biolabs, Roche, Fermentas, Stratagene e Invitrogen. La enzima Taq polimerasa empleada para la reacción de PCR fue la DFS Taq DNA polimerasa de Bioron.

Los medios empleados en el cultivo celular, así como el suero fetal bovino y los antibióticos, fueron de la marca GIBCO® suministrados por Invitrogen.

### 2.2.2 Kits comerciales

Los kits comerciales empleados en la realización de este trabajo de fin de máster, han sido recogidos en la siguiente tabla (tabla 1).

Nombre	Utilidad	Casa Comercial
<b>GenElute™ Gel Extraction kit</b>	Purificación de DNA en gel	<b>SIGMA-Aldrich</b>
<b>GenElute™ Plasmid Miniprep kit</b>	Purificación de DNA plasmídico	<b>SIGMA-Aldrich</b>
<b>TA Cloning® kit</b>	Clonación de productos de PCR	<b>Invitrogen</b>
<b>QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit II</b>	Mutagénesis dirigida	<b>Stratagene</b>
<b>Transcriptor first strand cDNA syntesis</b>	Síntesis de cDNA	<b>Roche Applied Science</b>
<b>Rapid DNA Dephos &amp; Ligation Kit</b>	Defosforilación rápida y ligación de DNA plasmídico	<b>Roche Applied Science</b>
<b>TOPO®TA Cloning®kit</b>	Ligación de productos de PCR en vector PCR 2.1	<b>Invitrogen</b>

**Tabla 1:** Kits comerciales empleados durante este trabajo de fin de master.

### 2.2.3 Plásmidos

Los distintos plásmidos utilizados durante el desarrollo de este trabajo de fin de máster se recogen en la siguiente tabla (tabla 2). También se incluyen el esquema detallado de los dos vectores empleados en la transfección y creación de nuevas líneas celulares (figura 4).

Vector	Resistencia	Utilidad	Selección (células eucariotas)	Casa comercial	Pares de bases
<b>PCR® 2.1</b>	Ampicilina/ Kanamicina	Clonación productos de PCR	No	Invitrogen	3931
<b>pWPXLd</b>	Ampicilina	Control positivo de la infección	Si, fluorescencia	Invitrogen	10455
<b>pWPI</b>	Ampicilina	Sobreexpresión proteína MRPS12	Si, Fluorescencia	Invitrogen	11101
<b>pLOX-Tag-ires1</b>	Ampicilina	Inmortalización de células eucariotas	No	Invitrogen	12290
<b>psPAX2</b>	Ampicilina	Vector de empaquetamiento lentiviral	No	Tronolab	10703
<b>pMD2G</b>	Ampicilina	Vector de la envuelta lentiviral	No	Tronolab	5824

**Tabla 2:** Plásmidos usados durante el desarrollo de este trabajo.



### 2.2.4 Primers

Los distintos primers empleados durante el proyecto master se recogen en la siguiente tabla (tabla 3).

primers	secuencia(5'->3')	Utilidad	Tamaño del fragmento amplificado (pb)
<b>h R68L (F)</b>	CTGTGCACGTTTACCCT CAAGCCGAAG	Mutagénesis en secuencia MRPS12 humana	736 143B, 739 <i>Macaca nemestrina</i>
<b>h R68L (R)</b>	GGCTTCTTCGGCTTGA GGGTAAACGTC	Mutagénesis en secuencia MRPS12 humana	
<b>m L68R (F)</b>	CTGTCCACGTTTACCC GCAAGCCCAA	Mutagénesis en secuencia MRPS12 macaco	736 143B, 739 <i>Macaca nemestrina</i>
<b>m L68R (R)</b>	GGCTTCTTGGGCTTGC GGGTGAACGT	Mutagénesis en secuencia MRPS12 macaco	
<b>MRPS12 (F)</b>	GTTTAAACGCCACCAT GTCCTGGTCTG	Amplificar secuencia MRPS12 y clonar en MRPS12	736 143B, 739 <i>Macaca nemestrina</i>
<b>MRPS12 (R)</b>	GTTTAAACTGTTTATTA AAACCCC	Amplificar secuencia MRPS12 y clonar en MRPS12	
<b>MRPS12 483(F)</b>	AGCTGCGGCCGGCTTT CCG	Amplificar secuencia MRPS12 y clonar en MRPS12	187 143B y <i>Macaca nemestrina</i> (con MRPS12(F))
<b>SV40 (F)</b>	AGACTGTGAGGACTG AGG	Detección de vector de immortalización de COS	298
<b>SV40 (R)</b>	TTGGTACAGACCTGT GGC	Detección de vector de immortalización de COS	
<b>KanR (F)</b>	TTGGCTCGCGATAATG TCG	Detección de resistencia a kanamicina de células COS	174
<b>KanR (R)</b>	CTTGATGGTCGGAAG AGGC	Detección de resistencia a kanamicina de células COS	
<b>pWPI (F)</b>	TTTCAGGTGTCGTGAG GA	Comprobar el clonaje direccional en el vector pWPI	Con MRPS12 483(R): 212 Con MRPS12 (R): <ul style="list-style-type: none"> <li>• 761 143B</li> <li>• 764 <i>Macaca nemestrina</i></li> </ul>

**Tabla 3:** Primers usados durante el desarrollo de este trabajo.



### 2.2.5 Marcadores de pesos moleculares empleados

Los distintos marcadores de pesos moleculares empleados en electroforesis se recogen en la siguiente tabla (tabla 4).

Marcador de pesos moleculares	Fragmentos (pb)
Low mass ladder	2000, 1200, 800,400, 200,100
Lambda/Hind III	23130, 9140, 6557, 2322,2027
High mass ladder	10000, 6000, 4000, 3000, 2000,1000

Tabla 4. Marcadores de peso molecular empleados

## 2.3 Cultivos celulares

### 2.3.1 Cultivos celulares bacterianos

#### 2.3.1.1 Cepas bacterianas

Las bacterias empleadas en este trabajo se prepararon en el laboratorio del grupo GENOXPHOS a partir de una cepa **Subcloning Efficiency™ DH5α™ E.coli**. Se trata de una cepa bacteriana usada en las aplicaciones de clonaje cotidianas. Fueron suministradas por **Invitrogen™**

#### 2.3.1.2 Medios de cultivo bacterianos

Las cepas bacterianas usadas en este estudio se cultivaron en medio líquido LB (Luria-Bertani) con antibiótico. Las placas de LB-agar se prepararon con LB y agar añadiendo ampicilina a una concentración final de 100 µg/ml.

#### 2.3.1.3 Transformación de bacterias competentes

En primer lugar, se descongeló en hielo una alícuota de 50 µl de las bacterias competentes (almacenadas a -80°C), para cada transformación a realizar. Una vez descongeladas, se añadieron 2 µl de la ligación (provenientes de un volumen total de 10 µl), mezclando suavemente con la punta de la pipeta. A continuación se incubaron en baño de hielo y

cámara fría, durante 30 minutos. Tras la incubación, se realizó el shock térmico a 42°C durante 45 segundos, sin agitación. Rápidamente, se transfirieron los viales al baño de hielo y se incubaron durante 2 minutos. Una vez realizado el shock, se añadieron 250 µl de medio LB sin antibiótico a temperatura ambiente en cada vial. Seguidamente, se incubaron a 37°C durante 1 hora a 225 rpm (revoluciones por minuto), en agitación horizontal. Por último se sembró la totalidad del volumen de cada vial de transformación en placas de LB agar conteniendo el antibiótico conveniente para la selección y se incubaron en estufa a 37°C durante toda la noche.

#### ***2.3.1.4 Siembra de bacterias en placas de LB-agar y en medio LB***

Para seleccionar aquellas colonias que expresasen el plásmido transformado previamente, se utilizaron placas de LB-agar conteniendo el antibiótico deseado y atemperadas a 37°C durante 30 minutos.

Se sembró la totalidad del volumen de cada vial de transformación, en placas de LB-agar conteniendo el antibiótico adecuado, con la ayuda de un asa de siembra de metacrilato, esterilizada previamente a la llama con etanol al 70%. Finalmente, se introdujeron las placas de forma invertida, en el incubador a 37°C, donde se mantuvieron durante 16-18 horas.

La siembra de bacterias en medio LB líquido, se realizó partiendo de una colonia proveniente de una placa de LB-agar o de un glicerol con ayuda de un palillo estéril. Las bacterias se incubaron a 37°C, en agitación (225 rpm) dejándolas crecer durante toda la noche.

#### ***2.3.1.5 Incubación del DNA plasmídico***

Las colonias seleccionadas se inocularon, con ayuda de un palillo estéril, en cinco mililitros de medio LB con el antibiótico apropiado y se dejaron incubar a 37°C con agitación durante toda la noche. Al día siguiente, se purificó el plásmido y se comprobó por digestión, visualizándolo mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa.

#### ***2.3.1.6 Conservación de las colonias de interés***

Las colonias de interés, partiendo del cultivo líquido fresco, se congelaron en glicerol como agente crioprotector. Se hicieron alícuotas de 0,8 ml de bacterias en medio LB y 0,2 ml de glicerol al 75%. Los criotubos se conservaron y almacenaron a -20°C ó -80°C.

La descongelación de las cepas para su uso posterior, se realizó en hielo. Sin permitir la completa descongelación del criovial, se raspó con ayuda de un palillo o una punta amarilla

estéril, un poco su superficie. Seguidamente se inocularon 5 ml de LB líquido con el antibiótico correspondiente. A continuación, se incubaron a 37°C en agitación, durante 16-18 horas.

## **2.3.2 Cultivos celulares eucariotas**

### **2.3.2.1 Líneas celulares eucariotas**

Las líneas celulares empleadas en este proyecto fueron: una línea de células inmortalizadas de *Cercopithecus aethiops* (COS-1), línea celular 143B procedente de una línea celular derivada de osteosarcoma humano (143B) y una línea procedente de un explante primario de *Macaca Nemestrina* (NM). Todas estas líneas fueron obtenidas de la facultad de veterinaria de Zaragoza.

### **2.3.2.2 Medios de cultivo**

Para el crecimiento de las distintas líneas fibroblásticas de ratón usadas en este trabajo, se utilizó un medio de cultivo preparado a partir de medio comercial DMEM (GIBCO™) rico en glucosa (4,5 g/l), con piruvato de sodio (0,11 g/l) y glutamina (584 mg/l), suplementado con suero fetal bovino (SFB)(Invitrogen) al 5% (143B), y 10% (Macaca nemestrina y COS) el cual aporta proteínas y factores de crecimiento.

### **2.3.2.3 Siembra y mantenimiento celular**

Las células se sembraron en placas de Petri, aptas para cultivo celular, de 40, 60, 100 y mm de diámetro, en función de las necesidades, a una densidad entre 10000-1000000 células /ml de medio de cultivo, a las que se les añadieron 0.2 ml de medio de cultivo/cm<sup>2</sup> de superficie de la placa.

Los cultivos se mantuvieron durante su crecimiento en un incubador a 37°C, en una atmósfera húmeda conteniendo un 5% de CO<sub>2</sub>, cambiándoles el medio periódicamente cada 2 ó 3 días. Cuando los cultivos celulares se sometieron a la acción de ciertos compuestos químicos, como inhibidores de la cadena de transporte electrónico o antioxidantes. El medio se renovó cada 24h.

Debido a que las líneas celulares usadas en este trabajo son todas adherentes y crecen en monocapa, la resiembra se realizó por tripsinización, cuando éstas alcanzaron la confluencia en la placa de cultivo. Para ello, tras eliminar el medio de cultivo por succión, las células se

lavar con PBS (GIBCO™), con el fin de eliminar las proteínas del suero que inhiben la acción de la tripsina. A continuación, una vez eliminado el PBS de la placa, se añadió 0,033 ml/cm<sup>2</sup> de una mezcla de 0.05% de tripsina (SIGMA) y 0,02% de EDTA en PBS (esterilizada mediante filtros de 0,22 µm de tamaño de poro Stericup™ de Millipore)), y se incubó durante 2-3 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo, se comprobó que las células se hubieran despegado y se añadió un volumen adecuado de PBS suplementado con 10% de SFB, para recoger las células en suspensión y pasarlas a un tubo Falcon de 15 ml para su posterior centrifugación (1750 rpm, 5 minutos). El pellet celular se resuspendió en el volumen adecuado de medio de cultivo para su división, conteo o congelación inmediata.

Todos los medios usados para lavar, tripsinizar, centrifugar y cultivar las células, se precalentaron a 37°C, en un baño de agua.

#### ***2.3.2.4 Congelación y descongelación celular***

Las células a congelar se dejaron crecer hasta un 70-80% de confluencia en placa de 100 mm, se tripsinizaron y se recogieron por centrifugación. El pellet celular obtenido, se resuspendió en 1ml de medio de congelación (DMEM con 10% de SFB y 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO, SIGMA), como agente crioprotector) pasándolo a un tubo criogénico resistente a N<sub>2</sub> líquido, convenientemente etiquetado. La suspensión celular se congeló lentamente (descenso de aproximadamente 1°C/min). Para ello los criotubos se llevaron rápidamente a un congelador a -80°C, donde se almacenaron durante al menos un día en una caja de congelación con isopropanol, para favorecer que la congelación fuese paulatina y uniforme. Al día siguiente, se pasaron a un contenedor de N<sub>2</sub> líquido donde pueden mantenerse durante largos períodos de tiempo (años) sin deterioro celular apreciable. El almacenamiento a temperaturas tan bajas como -80°C es posible aunque se detecta deterioro de las células a las pocas semanas o meses.

La descongelación de los criotubos almacenados se realizó rápidamente, diluyendo la el agente preservante (DMSO) con la mayor rapidez. Una vez que las células se adhirieron a la placa, se cambió el medio de cultivo para eliminar cualquier traza de DMSO que pudiese quedar y afectar negativamente a las células

### **2.3.2.5 Contaje celular**

Las células se tripsinizaron, se sedimentaron por centrifugación y se resuspendieron en un volumen adecuado de medio de cultivo tomándose una alícuota de 50 µl en un tubo eppendorf. Dicha alícuota se diluyó a la mitad con una solución del colorante Azul Tripán 0.4% en NaCl 0,15 M, dicha molécula coloreada de gran peso molecular, sólo es capaz de entrar en la célula si la membrana plasmática se encuentra dañada, permitiendo distinguir entre la células vivas y las muertas.

Para el recuento celular, tras colocar un cubreobjetos de cristal sobre la cámara de Neubauer, se depositó con la ayuda de una micropipeta, una gota de la mezcla de las células y el colorante, de modo que por capilaridad el líquido entre por el espacio que queda entre el cubreobjetos y la cámara.

Finalmente, se contaron las células blancas presentes en los cuatro cuadrantes y se calculó la densidad celular (nº de células/ml de medio de cultivo) de la suspensión celular inicial, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Nº de cél/ml} = \text{nº de células totales contadas} \times 10.000 \times 2 (\text{dilución}) / 4 (\text{nº de cuadrantes contados})$$

## **2.4 Transfección celular**

La generación de distintas líneas celulares que expresan una determinada proteína de manera estable o transitoria, se llevó a cabo mediante la técnica de transfección celular. Para ello, se utilizó un reactivo comercial FUGENE® HP (Invitrogen).

El proceso consta de varias etapas que se llevaron a cabo en distintos días, tal y como se detalla a continuación:

### **- Día 1:**

El primer día del ensayo se llevó a cabo la transfección de la línea celular empaquetadora, 293T, con tres vectores plasmídicos distintos. Dos de ellos portan información para la generación de la envuelta (pMD2G), la cápside y la polimerasa (psPAX2) del virus y el tercero (pWPI o pWPXLd) contiene clonado el gen que deseamos expresar, mediante el sistema de infección lentiviral, en la línea celular de elección.

La transfección química de la línea 293T se realizó utilizando el sistema FUGENE, (Roche), formado por una mezcla de lípidos y otros componentes disueltos en etanol al 80%.

El día anterior a la transfección, se sembraron las células 293T en placa de 6 pocillos a una densidad adecuada para alcanzar entre el 60 y el 80% de confluencia, y se procedió tal y como se indica en las instrucciones del fabricante.

Se utilizan tres vectores; 3,5 µg de plásmido pMD2G, 6,55 µg de psPAX2 y 10 µg del que contiene el gen que se desea expresar. Se añade FUGENE:DNA con relación 3:1. Es decir, se añaden 60 µl de FUGENE en 940 µl de un medio libre de aditivos ya que hay 20 µg de DNA en total

*-Día 2:*

Este segundo día se sembraron también las células que iban a ser infectadas con los virus producidos por 293T en las 48-72 h posteriores a la transfección inicial. Para ello, se sembraron en placas de 100 mm de diámetro de 6 pocillos (en función del experimento) a una densidad celular adecuada para tener una confluencia del 70% el día de la infección.

*- Día 3:*

Transcurridas 24 horas tras la transfección de la línea celular 293T con los vectores lentivirales, se pueden recoger los lentivirus empaquetados que se encuentran en el medio de cultivo. A las 48 horas se puede recoger de nuevo el medio, que contendrá una menor cantidad de lentivirus.

El medio de las células 293T se centrifugó a 1500 – 2000 rpm durante 5 minutos y se filtró a través de un filtro de 0.45 µm de tamaño de poro para evitar la contaminación de las células a infectar con células productoras de virus. A continuación, se añadió polibreno a una concentración final de 8 µg/ml, para aumentar la eficiencia de la infección, y se vertió la mezcla sobre la placa de células a transfectar.

*- Día 5:*

El medio de las células infectadas durante dos días consecutivos, se cambió a medio de selección. Esto además permite eliminar los restos de polibreno, que puede resultarles tóxico.

## **2.5 Extracción, manipulación y análisis de ácidos nucleicos**

### **2.5.1 Extracción de RNA total de cultivos celulares en monocapa**

Las células se lisaron directamente sobre la placa de cultivo por la adición de TRIzol®. Se partió de una placa de 100 mm expandida hasta un 90% de confluencia, el medio de cultivo fue retirado por succión y se añadieron 2 ml de TRIzol®, resuspendiendo varias veces el lisado celular con ayuda de una pipeta Pasteur de vidrio estéril a fin de maximizar la ruptura y disgregación celular. El homogeneizado se recogió en dos tubos eppendorf, que se preservaron en baño de hielo.

El homogeneizado se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la disociación de los complejos formados entre proteínas y ácidos nucleicos. Se añadió un volumen de 0.2 ml de cloroformo por mililitro de TRIzol® añadido para iniciar la extracción. Se agitó vigorosamente dejándose estabilizar a temperatura ambiente durante 3 minutos y se centrifugó a 12.000 g durante 15 minutos a 4°C. Se observó la aparición de dos fases, siendo la superior (acuosa) la que contiene el RNA recogiendo ésta en un nuevo tubo eppendorf.

A la fase acuosa se le añadieron 0.5 ml de alcohol isopropílico por mililitro de TRIzol® empleado, para precipitar el RNA, incubando a temperatura ambiente durante 10 minutos y centrifugando posteriormente a 12.000 g durante 10 minutos a 4°C.

El sobrenadante se retiró con cuidado para evitar arrastrar el RNA precipitado depositado en el fondo del tubo. El precipitado se lavó dos veces con un mililitro de etanol al 75% en agua DEPC (dietilpirocarbonato, compuesto capaz de eliminar la actividad de las RNAsas) cada vez agitándolo suavemente con ayuda de un agitador vórtex y centrifugando a 9000 rpm durante 5 minutos a 4°C.

El sobrenadante se eliminó con ayuda de una pipeta Pasteur de vidrio estéril y se dejó secar al aire a temperatura ambiente protegido. Finalmente el precipitado de RNA se redisolvió en 50 µl de agua DEPC y se incubó a 60°C durante 10 minutos para garantizar la correcta redisolución. Las muestras se cuantificaron empleando un espectrofotómetro Nanovue™ y se almacenaron hasta su procesamiento a -80.

### **2.5.2 Extracción de DNA nuclear de cultivos celulares en monocapa**

Una vez recogidos los pellet de células, estos se resuspendieron en 250ml de TE pH 7.5 (Tris 10Mm/ EDTA 1mM). Después se añadieron 1,25 µl de proteinasa K (20 mg/ml), 5 µl ribonucleasa (10 mg/ml) y 5 µl de dodecilsulfato sódico (SDS) (20%) y se incubaron 3 horas con agitación a 50°C con el objetivo principal de romper las membranas celulares y liberar el contenido celular interno. Después se realizaron dos extracciones; la primera con 375 µl de una mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) que luego se centrifugó a 14.000rpm durante 5 minutos. Esto formó un sistema de dos fases con un sólido blanco en el límite de las dos fases. Se pasó la fase acuosa (la de arriba) a otro tubo y se realizó otra extracción con 250 µl de una mezcla cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Le siguió una centrifugación a 14.000 rpm durante 5 minutos y se volvió a extraer la fase acuosa a otro tubo. El objetivo de estas extracciones era separar y limpiar el DNA de proteínas unidas al DNA. Posteriormente se precipito el DNA de la solución acuosa añadiendo 375 µl de isopropanol. Esta solución se mezcló por inversión y se dejó 15 minutos a -20°C. Una vez que se obtuvo el DNA precipitado, se centrifugo 14.000 rpm durante 5 minutos, se lavó con 500 µl de etanol (75%) y se volvió a centrifugar de nuevo con las mismas condiciones (14.000 rpm, 5 minutos). El producto se resuspendió en 100 µl de Tris-HCl 10mM pH 8 y se guardó a -20°C.

### **2.5.3 Extracción y purificación de DNA plasmídico**

Aquellas colonias de las que se deseara extraer el DNA plasmídico se picaron y se crecieron en un tubo eppendorf en un volumen de 4 ml de LB (100 µg/ml ampicilina) a 37°C con agitación durante toda la noche para el día siguiente extraer plásmido usando el kit comercial GenElute™ Plasmid Miniprep kit (SIGMA).

### **2.5.4 Purificación de DNA a partir de geles de agarosa**

Para purificar productos de digestión de DNA a partir de geles de agarosa, éstos se cargaron en geles del 0.5 al 2% de agarosa en función del tamaño del fragmento a purificar. Tras desarrollarse la electroforesis, el fragmento de DNA se visualizó bajo luz UV y se recortó la banda de agarosa que lo contenía con ayuda de un bisturí estéril. El DNA se purificó utilizando el kit comercial “GenElute™ Gel Extraction Kit” (SIGMA) (ver Tabla 1 de esta misma sección), siguiendo las instrucciones del fabricante del mismo.



### **2.5.5 Cuantificación de DNA**

Para determinar la concentración y pureza del DNA en nuestras preparaciones, se empleó un espectrofotómetro NanoVue™. La relación de las absorbancias obtenida a 260 nm y a 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) da idea del grado de pureza de la preparación, considerándose una buena pureza cuando se obtienen relaciones de  $A_{260}/A_{280} \approx 1.8$  para DNA. Para realizar las medidas, se depositaron 2 µl de la disolución de DNA en el pedestal del aparato y tras la medida, se obtuvo directamente tanto la concentración como la relación de absorbancias.

### **2.5.6 Secuenciación automática del DNA**

La secuenciación de los fragmentos de DNA clonados en el vector pCR® 2.1, se realizó en el Servicio de Secuenciación de DNA de la empresa Secugen S.L.

Para cada reacción de secuenciación se requerían 15 µL de DNA plasmídico, a una concentración de 100 ng/ µL. Como oligonucleótidos cebadores de las reacciones de secuenciación se utilizaron los específicos del vector (M13 F y M13 R, en el caso del vector pCR® 2.1), provistos por el propio servicio de secuenciación y el primer pWPI en el caso del vector pWPI con el inserto clonado. En este caso se añade un volumen de 1,5 µl de primer pWPI 5mM. Los resultados de la secuenciación se analizaron en un PC usando el programa *Codoncode Aligner v3.7.1*.

## **2.6 Programas de PCR empleados**

### **2.6.1 PCR de colonia (PCR de colonia)**

Con objeto de determinar la presencia de un determinado inserto en un plásmido expresado por una colonia bacteriana tras un proceso de transformación, se realiza la técnica de PCR de colonia o PCR de colonia.

Con un palillo estéril, se procede a inocular bacterias de cada colonia susceptible de presentar el inserto en 50 µl de medio LB en un tubo eppendorf de 1,5 mL, con el antibiótico para el que presente resistencia el vector de interés. Los tubos se incubarán a 37°C y con agitación de 700 rpm (revoluciones por minuto) durante 30 minutos.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se realizará otra a 95°C durante 5 minutos. Entonces, se centrifugan los tubos eppendorf durante 5 minutos a 12000 g. En el fondo del tubo eppendorf se observará un pequeño precipitado de restos bacterianos, y en el sobrenadante se encontrará en solución el DNA plasmídico que la colonia bacteriana presente. Pueden tomarse 3 µl de sobrenadante para PCR en condiciones habituales (empleando un volumen final de reacción de 25 µl), y amplificar fragmentos hasta de 700 pbs.

## 2.6.2 Amplificación de DNA por PCR utilizando como molde cDNA


En las reacciones de PCR en las que se utilizó DNA complementario (cDNA) como molde, se añadieron 500 ng de cDNA total, retrotranscrito a partir de RNA extraído a una mezcla de reacción de 50 µl de volumen final. La mezcla de PCR contenía los componentes que se recogen en la siguiente tabla (tabla 5).

Reactivo	Concentración inici	Volumen (µl)	Concentración final
<b>Tampón de reacción</b>	10 x	2,5	<b>1 x</b>
<b>Mix dNTPs</b>	25 mM	0,8	<b>0.2 mM /cada uno</b>
<b>Cebador- 5´</b>	10 µM	0,75	<b>0.4 µM</b>
<b>Cebador-3´</b>	10 µM	0,75	<b>0.4 µM</b>
<b>DSF Taq</b>	5 U/ µl	0,4	<b>0,08 U</b>
<b>DNA molde</b>	-	-	<b>20 ng (plasmídico) o 10µg (genómico)</b>
<b>Agua</b>	-	<b>hasta 25</b>	-

**Tabla 5.** Reactivos necesarios para llevar a cabo la reacción de PCR.

El programa de PCR utilizado para amplificar fragmentos de DNA se recoge en la siguiente tabla (tabla 6):

Paso	Tiempo	Temperatura
<b>1. Desnaturalización previa</b>	2 min	95°C
<b>2. Desnaturalización</b>	45 s	95°C
<b>3. Hibridación</b>	45 s	T <sub>m</sub> correspondiente para cada pareja de cebadores
<b>4. Extensión</b>	1-2 min	72°C
<b>5. Final de la reacción</b>	5 min	72°C



25 ciclos

**Tabla 6.** Programa de PCR convencional.

La temperatura de hibridación (T<sub>m</sub>) se determinó en función del par de cebadores utilizados.

El tiempo de extensión depende del tamaño del fragmento de DNA a amplificar. En general se estiman 2 minutos por cada mil pares de bases.

## 2.7 Técnicas de manipulación de plásmidos

### 2.7.1 Clonación de los productos de PCR en un vector plasmídico

Los productos de PCR que se desean clonar en algún vector de expresión mediante digestión con enzimas de restricción y posterior ligación, debían ser previamente clonados en otro vector del cual se escindieron con dichas endonucleasas. El vector plasmídico de clonaje utilizado para tal fin fue el denominado pCR<sup>®</sup> 2.1 suministrado en el kit de Invitrogen TOPO<sup>®</sup>TA cloning<sup>®</sup> kit (Tabla 1). Este kit contiene el vector linearizado unido a una topoisomerasa en el extremo 5' donde se encuentra una desoxitimidina (T). Esta enzima, como se explica más adelante, catalizara una reacción de inserción o ligación de productos de PCR en el vector pCR<sup>®</sup> 2.1 mucho más rápidamente que otros métodos de ligación.

El programa de PCR utilizado en estos casos se encuentra recogido en la Tabla 6, donde el último ciclo de amplificación a 72°C sirve para añadir una desoxiadenosina (A) al extremo 3' de los amplificados, imprescindible para la clonación del fragmento en el vector linearizado(extremo 5' con desoxitimidina). La ligación se realizó utilizando el producto de PCR reciente para evitar que se hubieran degradado las desoxiadenosinas añadidas en 3'.

Una vez cuantificado el producto de PCR, se utilizó la siguiente fórmula para calcular la cantidad de DNA (producto de PCR) necesaria para ligar con 50 ng del vector pCR<sup>®</sup>2.1 a una relación 1:1 (inserto: vector). En el caso de que no se obtuvieran transformantes se probaron relaciones de inserto: vector de 3:1 o 6:1.

$$X \text{ ng de producto de PCR} = \frac{(Y \text{ pb del producto de PCR})(50 \text{ ng pCR}^{\circ}2.1)}{(\text{Tamaño en pb del vector pCR}^{\circ}2.1: \sim 3900)}$$

Una vez calculada la cantidad de fragmento de PCR necesario para la ligación (tabla 7), se procedió, como describe el kit TOPO<sup>®</sup>TA cloning<sup>®</sup>, a incubarlo con los reactivos que se describen a continuación a temperatura ambiente durante 5 minutos. La ventaja de este kit es que tiene el vector unido a la topoisomerasa lo cual permite una rápida ligación del inserto de DNA al vector a diferencia de otros kit empleados que requieren de una ligación durante toda la noche. Esto permite realizar la transformación en las bacterias competentes directamente ese mismo día o almacenar el producto de ligación a -20°C hasta su uso.

Reactivos	Concentración inicial	Volumen (μl)
<b>Producto de PCR</b>	x	x
<b>Tampón de ligación</b>	10 x	1
<b>TOPO<sup>®</sup>PCR<sup>®</sup> 2.1</b>	25 ng/μl	2
<b>T4 DNA ligasa</b>	4 unidades Weiss/ μl	0,5
<b>Agua</b>	-	Hasta 6 μl

**Tabla 7:** Ligación de productos de PCR en el vector pCR<sup>®</sup>2.1.

### 2.7.2 Mutagénesis dirigida

La mutagénesis dirigida se realizó siguiendo las instrucciones del kit QuickChange II Site-Directed Mutagenesis kit y permitió hacer una mutación en un sitio puntual debido a que se emplearon primers que contienen la mutación deseada. El empleo de la enzima DpnI permite la eliminación de las hebras originales (ver en resultados y discusión una explicación más detallada). Se realizó una PCR en condiciones normales descritas en el apartado 2.6.2 solo que esta vez se emplearon los primers que contienen la mutación, es decir, h R68L (F)/(R) y m L68R (F)/(R) (tabla 3). Después se introdujeron los productos de PCR 2 minutos en un baño de hielo. Se añadió 1 µl de DpnI que se mezcló suavemente. Posteriormente se le dio un pulso y se incubó 1 hora a 37°C en un termoblock. Después de esta incubación, los productos de PCR están listos para la transformación en bacterias *E. coli* competentes o se pueden almacenar a -20°C.

### 2.7.3 Digestión de vectores plasmídicos

Con el fin de liberar el fragmento de DNA mutado del vector pCR.2.1 se realizó una digestión con arreglo a la siguiente plantilla (tabla 8):

Reactivos	Concentración inicial	Volumen (µl)
DNA en vector pCR 2.1	x	El necesario que introduzca 1 µg
Vector pWPI	x	El necesario que introduzca 1 µg
Tampón de digestión	10 x	2
Albúmina sérica bovina	10 x	2
Endonucleasa de restricción	10.000 U/ml cada una	0,8 cada una
Agua	-	Hasta 20 µl

**Tabla 8.** Digestión de vectores plasmídicos mediante endonucleasas de restricción.

Después se realizó una separación en geles de agarosa y se extrajeron/ purificaron el fragmento de DNA y el vector como indica el apartado 2.5.4.

#### 2.7.4 Ligación de un determinado inserto en el vector de elección

Una vez purificados y cuantificados los fragmentos del vector e inserto, a partir de geles de agarosa se procedió a su ligación del mismo modo que en el apartado anterior. Para ello previamente se hubo de obtener la relación vector:inserto. Esto se realizó mediante los siguientes cálculos:

Condiciones de ligación empleadas para un volumen de 20 µl:

$$\mu g \text{ DNA} = \frac{\text{fentomoles DNA}}{3000} \times (\text{kpb})$$

- Extremos romos → 30 (fentomoles de vector): 90 (inserto)
- Extremos cohesivos → 30 (fentomoles de vector): 90 (inserto)

En nuestro caso son extremos romos por lo que las relaciones empleadas serán:

$$\mu g \text{ vector} = \frac{30 \text{ fentomoles DNA}}{3000} \times (11,1)$$

11,1 kpb es el tamaño del vector pWPI

$$\mu g \text{ inserto} = \frac{90 \text{ fentomoles DNA}}{3000} \times (0,72)$$

0,72 kpb es el tamaño del inserto (macaca y 143B tienen tamaños similares)

Relación final= 0,111 µg de vector: 0,022 µg de inserto

Una vez obtenida la relación se aplicó la siguiente tabla para los productos de ligación (tabla 9).

Reactivos	Concentración inicial	Volumen (µl)
DNA inserto	x	El necesario que contenga 0,022 µg
DNA vector	x	El necesario que contenga 0,111 µg
Buffer ligasa	10 x	2
Ligasa T4	4 unidades Weiss/ µl	1
Agua	-	Hasta 20 µl

**Tabla 9.** Cantidades para ligación de insertos de PCR en vectores.

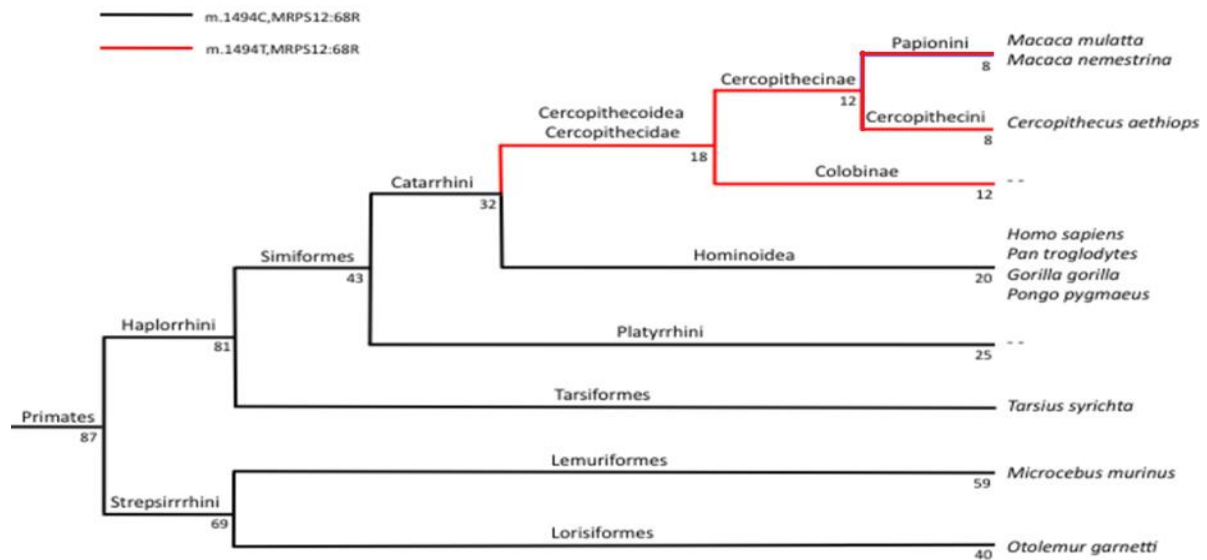
### 3 Resultados

---

#### 3.1 La mutación patológica humana m.1494C>T está fijada en la familia Cercopithecidae

En la búsqueda de los mamíferos que contenían la mutación patológica humana m.1494C>T como la forma silvestre, se alineó el gen MT-RNR1 (codificante de 12SrRNA) de 316 mamíferos. La forma 1494T se encontró en 24 de estos mamíferos y, en particular, en 17 primates pertenecientes a la familia Cercopithecidae. Sin embargo, la capacidad auditiva de estos primates es similar a la humana (Flowler et al, 2010).

Los primates se dividen en los subgrupos Strepsirrhini y Haplorrhini. A su vez Haplorrhini se divide en Tarsiformes y Simiformes. Simiformes pueden dividirse en Platyrrhini y Catarrhini y Catarrhini se subdivide en las superfamilias Hominoidea y Cercopithecoidea (Perelman et al, 2011). Con excepción de la superfamilia Cercopithecoidea, las demás familias tienen la forma 1494C incluidos los humanos. Para confirmar que 1494T es la forma silvestre de la familia Cercopithecoidea, se extendieron los análisis a 41 MT-RNR1 secuencias de diferentes especies de la familia Cercopithecidae (la única familia de la superfamilia Cercopithecoidea). Las especies incluidas fueron 12 de la familia Colobinae (3 de la tribu Colobini y 9 de la tribu Presbytini) y 9 de la especie Cercopithecinae (6 de la tribu Cercopithecini y 3 de la tribu Papionini). Todas las especies de la familia Cercopithecidae contienen una T en la posición 1494 (figura 5). De esta forma se confirmó que 1494T es la forma silvestre de la familia Cercopithecidae.



**Figura 5. Línea de evolución de los primates.** El número de debajo de cada línea indica el tiempo (en miles de años) en el que se generan nuevas familias de primates. En rojo se marca aquella familia que tiene la variante patológica humana m1494T como forma silvestre. En azul se marca la familia de primates que, además de tener la forma m1494T como forma silvestre, tienen un cambio en el aminoácido 68 de la proteína MRPS12. En otras palabras, la familia Papionini tiene la forma MRPS12:68L mientras que el resto tienen la forma MRPS12:68R.

### 3.2 El nucleótido 1494 es importante para la función del 12SrRNA

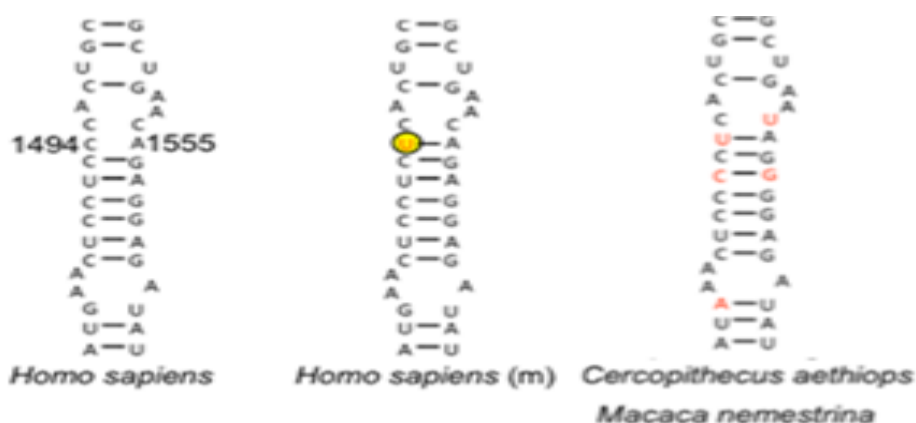
La mutación 1494 es patológica, sin embargo parece que la selección negativa y la presión selectiva no están actuando sobre la familia Cercopithecidae, puesto que no ha sido eliminada de la población. Una causa puede ser que porque los efectos fenotípicos solo se manifestaran en etapas post-reproductivas. Sin embargo, en humanos hay individuos que sí que sufrían el fenotipo de la enfermedad a etapas tempranas a su enfermedad. Una posibilidad podría ser que la mutación fuese patológica solo en hombres por lo que, al ser transmitida por la mujer, no hubiese selección negativa. Sin embargo, en los pedigríes se puede observar que las mujeres también están afectadas (Zhao et al, 2004; Rodríguez-Ballesteros et al, 2006; Zhu et al, 2009; Wei, Q. et al, 2013) Esto indica que dicho fenotipo podría estar bajo presión selectiva pero, ¿está esta mutación sufriendo selección negativa?



La posición 1494C esta conservada en 292 de 316 especies de mamíferos examinados y además, empleando ConSurf tool (<http://consurf.tau.ac.il>) para calcular el índice de conservación (CI) con escala de 1 a 9 siendo 9 el máximo grado de conservación y teniendo en cuenta la topología del árbol filogenético, se obtuvo un CI= 9/9 indicando que la posición está completamente conservada. Esto indica que la posición 1494 es importante y que la selección negativa está actuando en mamíferos.

### 3.3 Una sustitución en la proteína MRPS12:R68L podría compensar la mutación patológica m.1494C>T en macacos

Si es verdad que la selección negativa está actuando en la posición 1494 de los mamíferos, ¿Por qué la mutación 1494T no ha sido eliminada de la familia Cercopithecidae? Las mutaciones compensatorias se han considerado una posible explicación para la fijación de mutaciones patológicas codificadas por el mtDNA (Azevedo et al, 2009). Las mutaciones compensatorias suelen aparecer en el mismo gen en el que se encuentra la mutación patológica (Kondrashov et al, 2002) por lo que se analizó el sitio de decodificación del gen 12SrRNA pero en este caso no se vio que la mutación 1494T fuese compensada por un cambio de base en la posición 1555G y así evitar la formación del enlace entre las posiciones 1494 y 1555 (figura 6)



**Figura 6. Representación del sitio de decodificación 12SrRNA de humano normal, humano con la mutación.** El nucleótido mutado 1494 está en amarillo. En rojo se encuentran los nucleótidos diferentes entre la familia Cercopithecoidea y *Homo sapiens*.

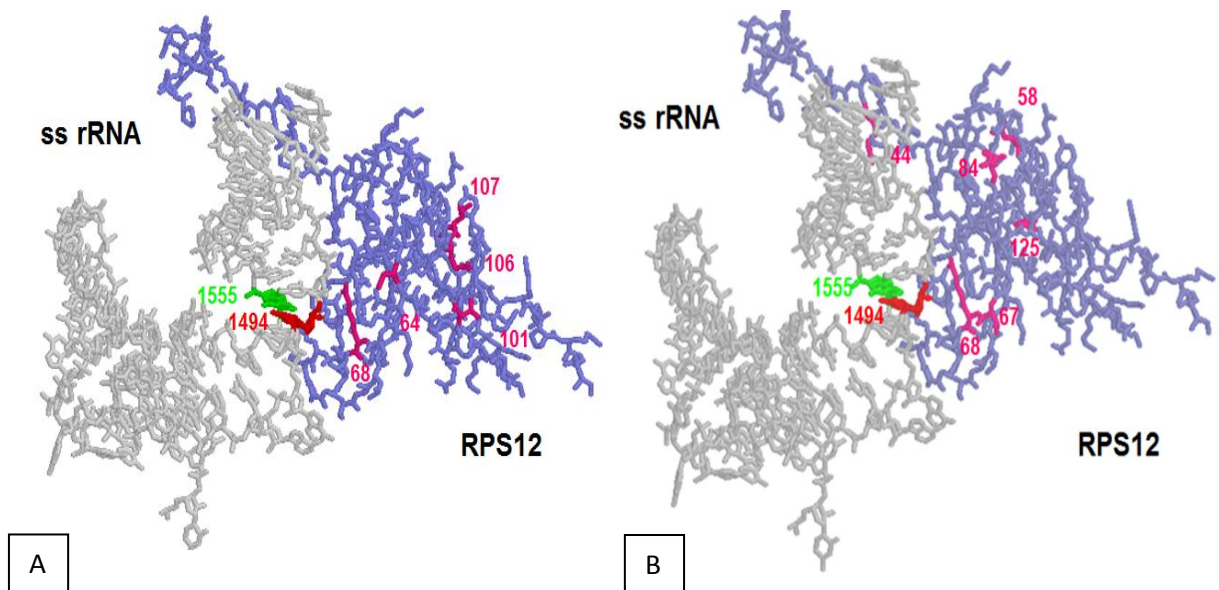
La proteína mitocondrial ribosomal S12 (MRPS12) es un componente crítico del sitio de decodificación (Vila-Sanjurjo et al, 2007) y se han descrito mutaciones compensatorias entre proteínas ribosomales y variantes de rRNA (O' Connor et al, 1991). Por ello se compararon las secuencias de MRPS12 entre humano y uno de los miembros del grupo Cercopithecidae *Macaca Mulatta* y se observó que había varios aminoácidos diferentes en la secuencia. Pues los aminoácidos 64C, 68R, 101T, 106Q y 107I de la proteína humana corresponden con 64S, 68L, 101N, 106H y 107V en *Macaca Mulatta*. Después hubo que confirmar la importancia de estos aminoácidos y para ello se empleó el consurf tool dando mayor importancia a aquellos aminoácidos más conservados entre especies. Los resultados (empleando la escala CI= 1-9) fueron: 64C=5, 68R=9, 101T=1, 106Q=7 y 107I=4 indicando que el aminoácido 68R estaba conservado en todas las especies de primates menos en el grupo de Papionini que tienen una Leucina en esa posición (figura 7).

#### Mammals

<i>Homo sapiens</i>	RLCTRTQIV
<i>Pan troglodytes</i>	RLCTRTQIV
<i>Gorilla gorilla</i>	RLCTRTQIV
<i>Pongo abelii</i>	RLCTRTQIV
<i>Macaca mulatta</i>	RLSTLRNHVV
<i>Macaca nemestrina</i>	RLSTLRNHIV
<i>Tarsius syrichta</i>	RLRIRRS HVV
<i>Microcebus murinus</i>	RLRIRRS HVV
<i>Otolemur garnettii</i>	QLRIRRTHVV

**Figura 7. Secuencias de la proteína MRPS12 de varios mamíferos.** Solo se señalan los aminoácidos 44, 58, 64, 67, 68, 84, 101, 106, 107 y 125. En amarillo se señalan las secuencias a comparar de humano y macaco. En azul se encuentran los aminoácidos que coinciden entre humano y macaco. Aquellos aminoácidos en los que se diferencian las secuencias de humano y Macaco están marcados en rojo (*Macaca mulatta* y *Macaca nemestrina*). *Macaca mulatta* y *Macaca nemestrina* se diferencian solo en el aminoácido 107.

Para comprobar si este aminoácido, que se encuentra muy conservado, juega un papel importante en la mutación 1494, este se localizó en la estructura cristalina de un ribosoma bacteriano (*Thermus thermophilus*) donde se vió que el aminoácido 68 está localizado a unos 6 Å de distancia del nucleótido m.1494, mucho más cerca que el resto de aminoácidos polimórficos, los cuales se encuentran mucho más alejados (figura 8A). También se sabe que mutaciones en el aminoácido 68 confieren resistencia a *Escherichia Coli* a el error inducido por aminoglicósidos (Agarwal et al, 2011).



**Figura 8. Interacción entre la zona codificante del rRNA mitocondrial y RPS12.** A) Se puede apreciar que, de entre todos los aminoácidos de la proteína ribosomal S12 diferentes entre humano y macaco (en rojo), el aminoácido 68 es el más próximo a región 1555 (verde) y 1494 (rojo) por lo que se piensa que un cambio en este aminoácido tendrá mayores consecuencias que en los demás. B) Se puede apreciar que, de entre todos los aminoácidos polimórficos de la proteína ribosomal S12 humana (en rojo), el aminoácido 68 es el más próximo a región 1555 (verde) y 1494 (rojo).

### 3.4 Las células Cercopithecidae son resistentes a los aminoglicósidos

Puesto que la proteína MRPS12:68L puede jugar un papel muy importante en el sitio de decodificación A del ribosoma se quiso analizar el efecto de los aminoglicósidos en las células Cercopithecidae. Para ello, se obtuvieron fibroblastos primarios de la piel de Macaca Nemestrina (MN) (macaque, tribu Papionini) y una línea de células inmortalizadas (COS-1) de *Cercopithecus aethiops* (grivet, tribu Cercopithecini) y se confirmó mediante secuenciación que tenían una timina en la posición 1494 (figura 9).

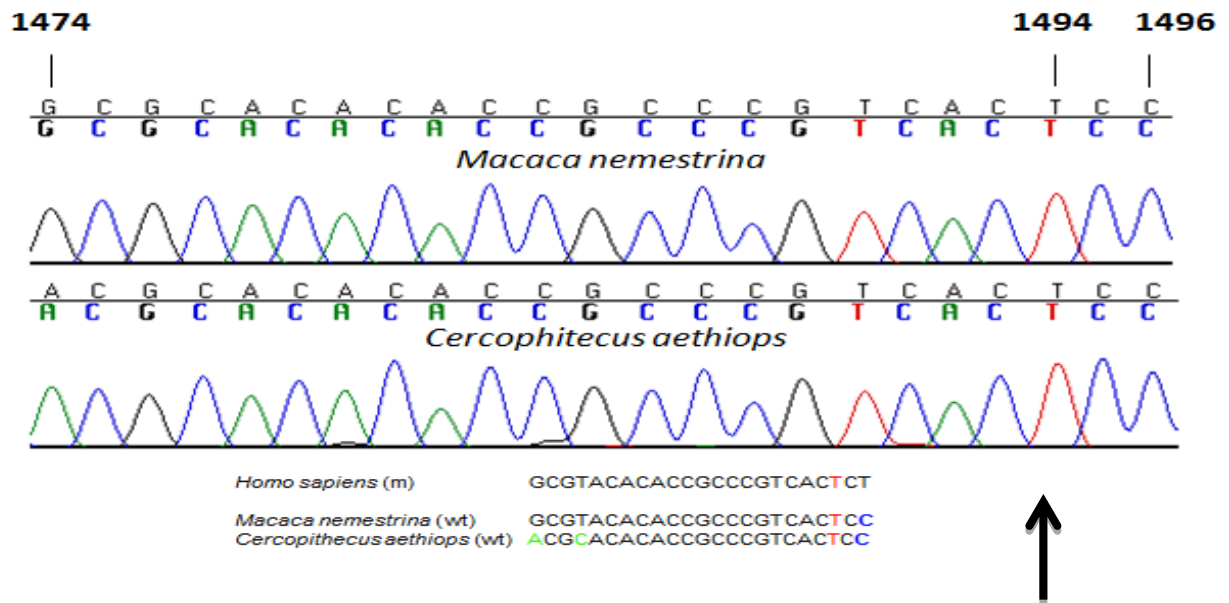


Figura 9. Secuenciación de la posición 1494 en MN y COS-1. La flecha negra señala la posición 1494 donde hay una T. La secuencia de comparación es la del *Homo sapiens* mutada.

Después se confirmó la presencia del aminoácido leucina (en MN) y arginina (en COS-1) en la posición 68 de MRPS12 (figura 10). También se encontraron otros aminoácidos distintos entre COS-1 y MN (S29A, V107I y T124K).

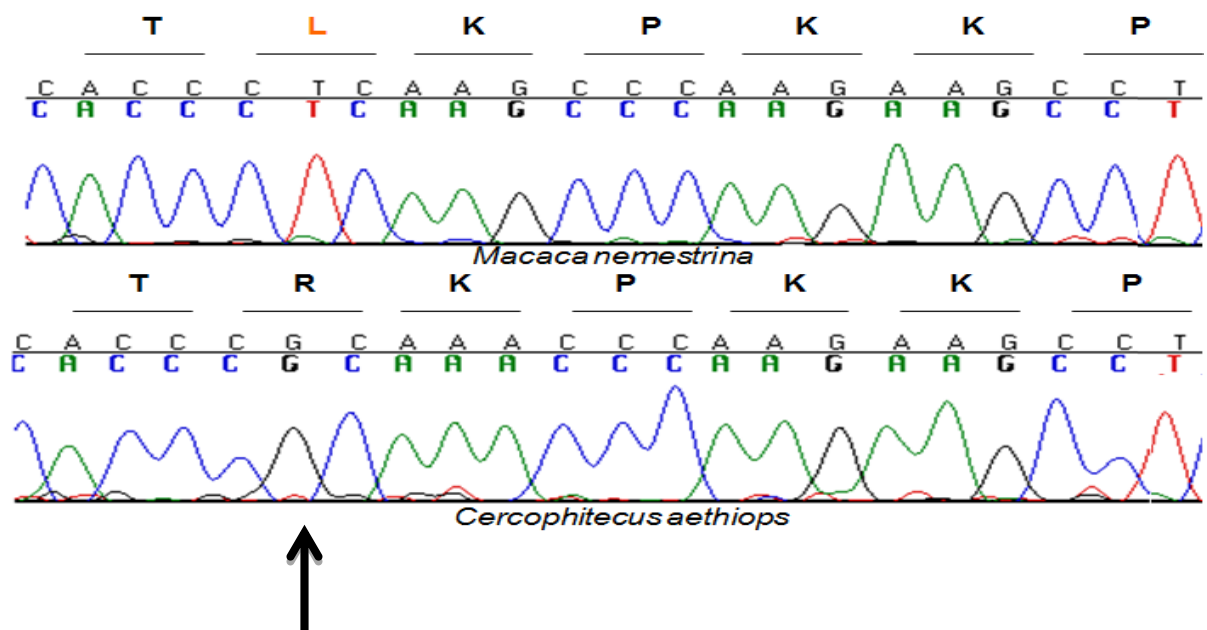
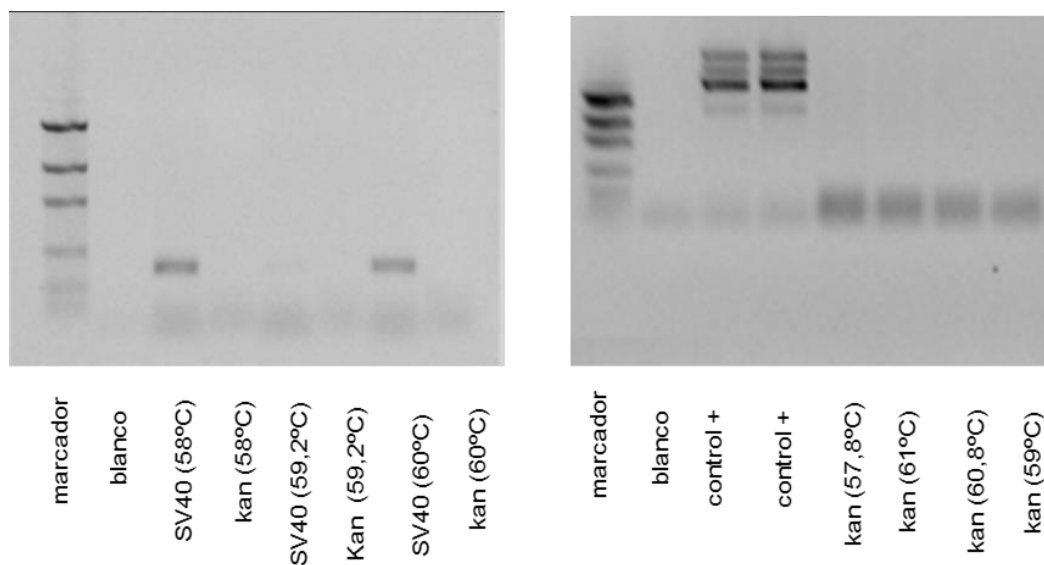


Figura 10. Parte de la secuenciación de MRPS12 de MN y COS-1. En MN hay una leucina mientras que en COS-1, (al igual que en *Homo sapiens*) hay una arginina en la posición 68.

Para analizar el comportamiento de las células de MN, estas se cultivaron con aminoglicósidos en concentración de 2 y 4 mg/ml y el crecimiento fue similar en medios con o sin antibiótico (figura 12). No se pudieron analizar las células de COS-1 porque habían sido previamente immortalizadas con el vector p652(pMKSV40/8-4) que contiene un gen de resistencia a aminoglicósidos. No obstante, se emplearon 2 parejas de primers para amplificar los genes SV40 (control que se encuentra en el vector de immortalización) y el de kanamicina. Empleando diferentes temperaturas de hibridación de primers no se logró amplificar el gen de kanamicina mientras que sí que hubo amplificación cuando se emplearon los primers SV40 (figura 11)

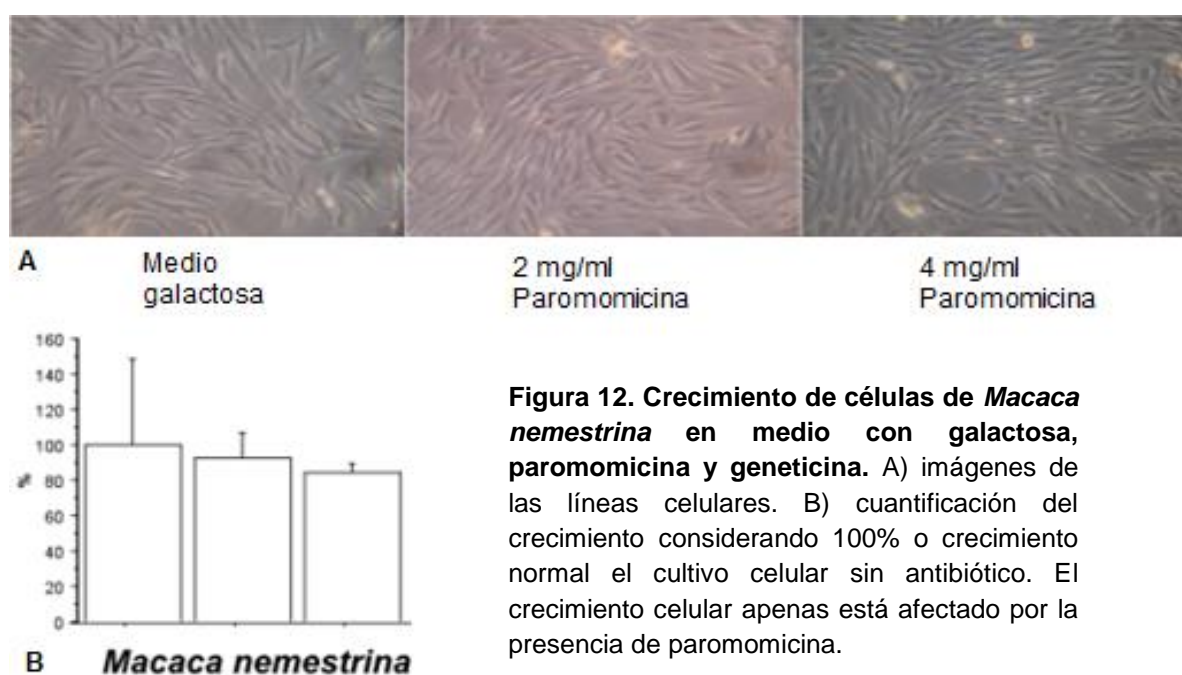


**Figura 11. Geles de electroforesis de la línea celular COS-1.** Amplificación, en DNA de las células COS-1, de las regiones SV40 y Kan del vector p652pMKSV40 8-4 empleado en su immortalización. Se indican las diferentes temperaturas de hibridación utilizadas. No hubo amplificación del gen de resistencia a kanamicina.

Visto que no había resultados en la amplificación, se cultivaron las líneas celulares COS-1 y una línea derivada del osteosarcoma humano (143B) en medio con aminoglicósidos. El crecimiento de las células COS-1 no estaba afectado por geneticina al contrario que la línea 143B, aunque no se haya podido amplificar el gen de resistencia a aminoglicósidos.

Los aminoglicósidos no tienen un efecto importante en los ribosomas mitocondriales de las células de MN al contrario de lo que se ha visto previamente en otros estudios con líneas celulares de linfoblastos immortalizados y de híbridos 143B, las cuales albergan la mutación

m.1494C>T muestran un mayor tiempo de crecimiento cuando se les añade aminoglicósidos (2mg/ml) al medio (Zhao et al, 2004; 2005). Un resultado similar ocurre con estas líneas celulares cuando albergan la mutación m.1555A>G al ser cultivadas en el mismo medio (Pacheu-Grau et al, 2011). Estos resultados muestran que es muy probable que la mutación esté compensada en la familia Papionini.



**Figura 12. Crecimiento de células de *Macaca nemestrina* en medio con galactosa, paromomicina y geneticina.** A) imágenes de las líneas celulares. B) cuantificación del crecimiento considerando 100% o crecimiento normal el cultivo celular sin antibiótico. El crecimiento celular apenas está afectado por la presencia de paromomicina.

### 3.5 MRPS12 podría ser un factor modificante que explique la incompleta penetrancia de la mutación patológica humana m.1494C>T y la ausencia del fenotipo patológico en MN

Los resultados previos sugieren que la variante de la proteína MRPS12 puede ser un posible factor modificante que podría explicar la incompleta penetrancia de la mutación m.1494C>T. Por ello se buscó variantes en la secuencia de la proteína humana y se encontraron 9 (3 de ellos en la secuencia de importe a la mitocondria : rs143032757, G5S; rs33988199, H8R; y rs150096976, R23W y 6 en la proteína madura: rs147007310, R44G; rs143630390, L58P; rs111688400, T67S; rs147184696, R68C; rs140018981, R84W; y rs143918075, V125I). Para confirmar la importancia de los aminoácidos R44, L58, T67, R68, R84, V125 se estimó el CI empleando el programa consurftool y se obtuvieron valores de 1, 7, 7, 9, 9 y 7

respectivamente, y se localizaron estos aminoácidos en una estructura cristalina del ribosoma de una bacteria (*Thermus thermophilus*) (Figura 8B). El aminoácido 68, como se ha mencionado previamente, está muy conservado y es el más cercano al nucleótido m.1494 (a menos de 6 Å), el resto de posiciones polimórficas están lejos de m.1494. Las posiciones equivalentes a RPS12 68 y 125 en *Escherichia coli* confieren resistencia a aminoglicósidos (Agarwal et al, 2009). Además, mutaciones en la proteína MRPS12 podrían ser causas de sordera autosómica dominante (Shah et al, 2001).

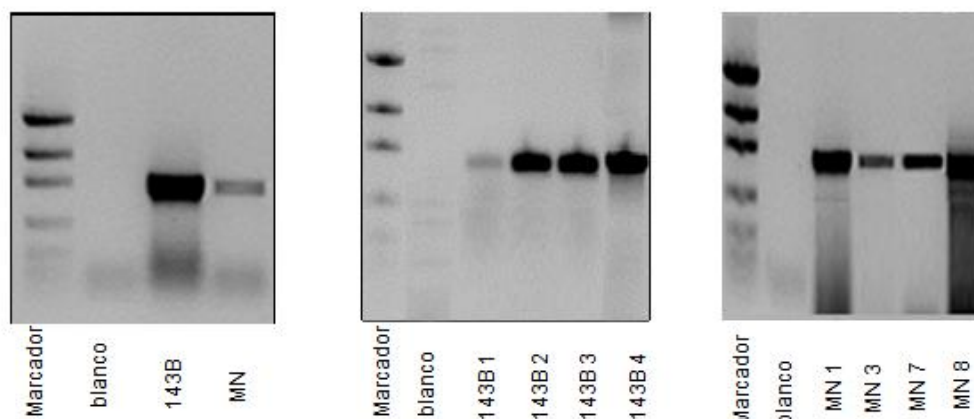
### **3.6 Estudio del aminoácido 68 de la proteína MRPS12 como factor que modifica el efecto de la mutación m.1494C>T**

Para estudiar el posible papel de los polimorfismos de MRPS12, expresamos la proteína silvestre y la proteína con variantes en el aminoácido de la posición RPS12 68 en las líneas celulares humana (143B) y de macaco (MN) (m.1494C y m.1494T respectivamente).

La proteína MRPS12 se clonó a partir de cDNA derivado de las líneas celulares. Para evitar la senescencia de la línea NM, esta se inmortalizó utilizando el vector pLOX-Ttag-IresTK (MN<sup>LOX</sup>).

Se ha descrito que la localización de los mRNAs codificantes de proteínas mitocondriales en la proximidad de la mitocondria está mediada por las secuencias 3'UTR. En el caso de la proteína MRS12 las señales responsables de la localización se encuentran en los primeros 154 nt de la secuencia 3'UTR ( Russo A. et al, 2008.)

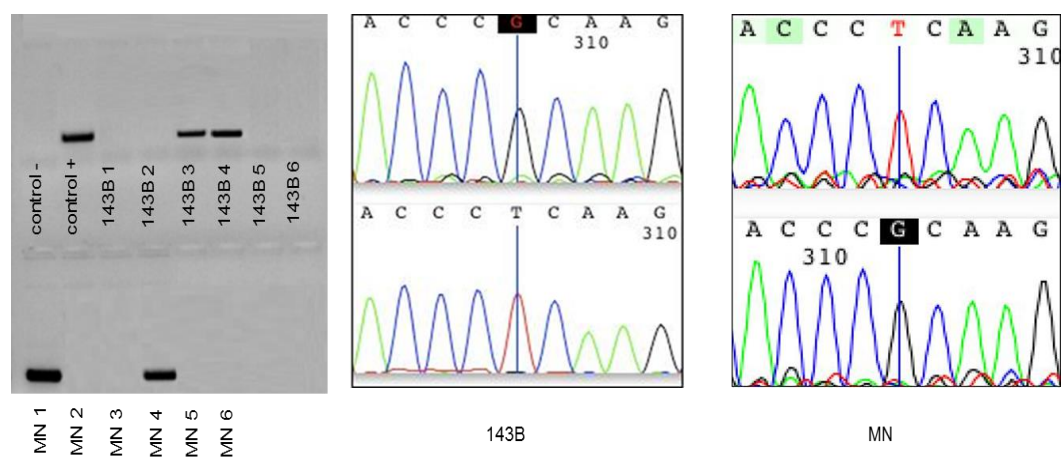
Se clonó por tanto la secuencia codificante de la proteína MRS12 junto con su secuencia 3'UTR completa en cada caso (figura 13).



**Figura 13. Geles de electroforesis de 143B y MN.** A) Producto de PCR (730pb) del cDNA de 143B y *Macaco nemestrina*. B) Colonias de PCR de colonia de 143B después de la ligación y transformación C) Colonias de PCR sucia de *Macaco nemestrina* después de ligación y transformación. Las colonias enviadas a secuenciar.

Las secuencias obtenidas se correspondieron con los transcritos consenso humano (MRPS12-201 ENST00000308018) y de macaco (ENSMMUT00000016525) recopilados en la base de datos ENSEMBL.

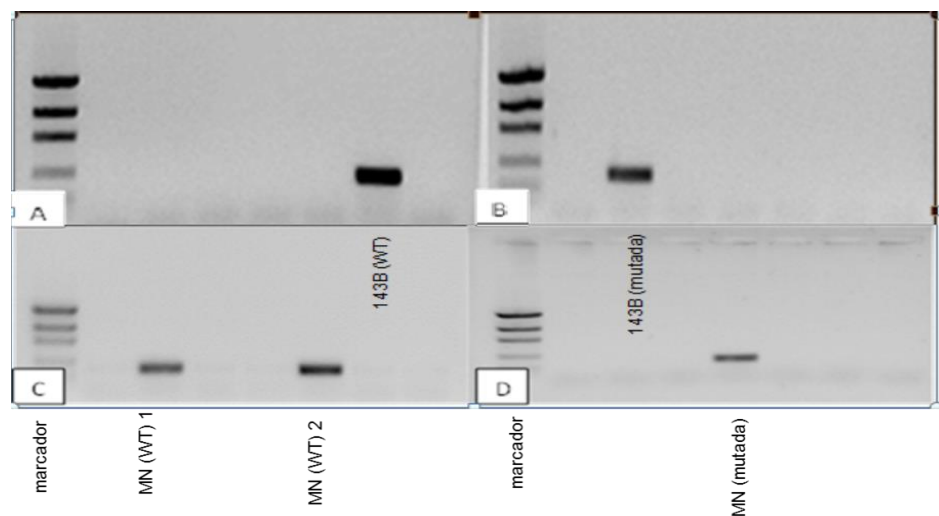
Mediante mutagénesis dirigida se introdujeron las mutaciones R68L y L68R respectivamente. El producto se volvió a transformar en bacterias y los plásmidos se enviaron a secuenciar (figura 14).



**Figura 14. Mutagénesis dirigida.** A) colonias candidatas enviadas a secuenciar. B) nucleótido mutado en 143B (arriba) en comparación con la secuencia de 143B inicial (abajo). C) nucleótido mutado en MN (arriba) en comparación con la secuencia de 143B inicial (abajo).



Las distintas variantes de la proteína MRS12 se transfirieron al vector de expresión lentiviral pWPI para su sobre-expresión en las líneas celulares humana y macaco respectivamente. Para ello los productos de ligación del vector se volvieron a transformar en bacterias y su plásmido se envió a secuenciar (figura 15). Se generaron así las líneas celulares 143B<sup>MRS12</sup>, (143B WT), 143B<sup>MRS12 (R68L)</sup> (143B mutada), MN<sup>LOX-MRS12</sup> (MN WT), MN<sup>LOX-MRS12(L68R)</sup> (MN mutada) (Tabla 10).



**Figura 15. Clonaje de los de las secuencias WT y mutada de 143B y MN en pWPI.** PCR de colonia de las bacterias que aceptaron el producto de ligación: A) 143B (WT). B) 143B (mutada). C) MN (WT). D) MN (mutada).

Nombre línea celular	Variante del gen <i>MT-RNR1</i>	Tipo MRPS12 sobreexpresada
143B pWPXLd (control -)	1494C	-
Macaco pWPXLd (control-)	1494T	-
143B <sup>MRS12</sup>	1494C	MRPS12:68R
143B <sup>MRS12(R68L)</sup>	1494C	MRPS12:68L
MN <sup>LOX-MRS12</sup>	1494T	MRPS12:68L
MN <sup>LOX-MRS12(L68R)</sup>	1494T	MRPS12:68R

**Tabla 10. Líneas celulares creadas.** Se resumen las características más significativas de cada línea celular.

Se utilizó el vector de expresión pWPI que no contiene ningún gen de resistencia a antibiótico, para evitar interferencias al estudiar el efecto de los aminoglicósidos. Este vector contiene después del sitio de clonaje una secuencia IRES y el gen que codifica GFP, de esta forma se puede confirmar la expresión del vector mediante inmunocitoquímica (figura 4).

Se crearon por duplicado las líneas celulares de la tabla 10; con alta y baja dosis infectiva de virus. Con alta dosis todas expresaron GFP, con baja dosis hubo que realizar una separación por citometría de flujo. El citómetro seleccionó las células que expresaban GFP: el 60% de las células 143B<sup>MRS12</sup>, 42% de las 143B<sup>MRS12 (R68L)</sup>, 21% de MN<sup>LOX-MRS12</sup> y 25% de MN<sup>LOX-MRS12(L68R)</sup>.

Se crean dos tipos de duplicados de líneas celulares (alta y baja dosis infectiva) porque interesa estudiar las células con alta y baja sobre-expresión de la proteína. Esto se debe a que no se sabe el distinto grado de toxicidad que puede inducirle a esta célula un mayor o menor grado de sobreexpresión.

### **3.1 Perspectivas futuras**

En investigaciones venideras se tendrá que confirmar que las líneas celulares contienen la secuencia de las variantes de la proteína MRPS12 que hemos introducido, y se deberá cuantificar el grado de sobreexpresión de dicha proteína para posteriormente estudiar su comportamiento. Para ello se medirá la velocidad de crecimiento (DT o “doubling time”) , el consumo de oxígeno y síntesis de ATP de las distintas líneas celulares en cultivo con y sin aminoglicósidos. Se medirá también la actividad de los complejos respiratorios por espectrometría.

## 4 Discusión de los resultados

---

### 4.1 MRPS12:68L como posible mutación compensatoria de m.1494C>T

La asociación de la mutación m.1494C>T a sordera no sindrómica en varios pedigríes con diferente mtDNA genético junto con el hecho de que el fenotipo bioquímico es transferido con el mtDNA en los modelos de híbridos confirmó la patogenicidad de esta mutación (Zhao et al, 2005). Sin embargo, la ausencia de fenotipo en muchos parientes maternos que contienen esta mutación homoplásmica, el hallazgo de esta mutación en individuos normales en un estudio de población y la carencia de diferencias entre líneas celulares mutantes de individuos sintomáticos y asintomáticos sugieren que hay incompleta penetrancia para esta mutación. Este hecho es también confirmado después de encontrar esta mutación patológica como la forma silvestre en la familia de primates Cercopithecidae (Carelli, V., 2003; Zhao, H. et al, 2005; Rodríguez-Ballesteros, M. et al, 2006; Bindu, L. H. et al, 2008).

Analizando el sistema de traducción mitocondrial en la familia Cercopithecidae, hemos sido capaces de encontrar un gen codificante de una proteína que puede funcionar como mutación compensatoria en los seres humanos (MRPS12:R68L). Esta mutación está localizada muy cerca de la posición m.1494 del 12SrRNA. Además, la posición 68 RPS12 equivalente en bacterias *Escherichia coli* juega un papel en la resistencia a errores en la traducción inducidos por la presencia de aminoglicósidos (Maisnier-Patin et al, 2007) y podría ser que esta mutación en MRPS12 compensase la mutación C1494T en 12SrRNA la cual incrementa la susceptibilidad a errores en la traducción inducidos por la presencia de aminoglicósidos.

## **4.2 Teorías para explicar el origen de la mutación patológica m.1494C>T y su posible mutación compensatoria MRPS12:R68L**

Varios escenarios han sido propuestos para explicar la aparición de mutaciones patológicas y mutaciones compensatorias. En la primera, se ha sugerido que primero aparece una mutación compensatoria que podría ser fenotípicamente neutra y estable, de tal forma que pueda expandirse rápidamente entre la población y arreglar un defecto genético que aparezca posteriormente. En un segundo escenario, ambas mutaciones son perjudiciales individualmente pero en conjunto tienen un efecto neutro de tal forma que ellas tienen que estar simultáneamente presentes en la población (DePristo et al, 2005). Además, el hecho de que la mayoría de las mutaciones mitocondriales sean heteroplásmicas (se requiere de un cierto porcentaje de mtDNA afectado para la expresión del fenotipo patológico) y que las mutaciones en el nDNA pueden ser encontradas en heterocigosidad facilita mucho la existencia de este segundo escenario en nuestro caso.

Sin embargo, la presencia de la forma 1494T en toda la familia de primates Cercopithecidae pero la ausencia de MRPS12:68L en la tribu Cercopithecini sugiere que la mutación mitocondrial es más antigua que la compensación nuclear (figura 5). Además, el hecho de que la familia Hominoidea se separase de la familia Cercopithecidae hace 32 millones de años y que la divergencia entre las especies de Cercopithecidae es de 18 millones de años (Perelman et al, 2011), sitúa la aparición de la mutación m.1494C>T entre hace 32 y 18 millones de años; mientras que la aparición de la mutación compensatoria MRPS12:R68L ocurre entre hace 12 (pues no aparece en Cercopithecini) y 8 millones de años (los millones de años que separan las familias Papionini y Cercopithecini). Esto quiere decir que, al menos 6 millones de años han pasado entre la aparición de la mutación patológica y la posterior mutación compensatoria y por ello, ninguno de los escenarios anteriores puede explicar esta situación particular por lo que uno se plantea la siguiente pregunta; ¿Cómo logró una mutación patológica sobrevivir tanto tiempo hasta la aparición de la mutación compensatoria?

Una posible explicación sería mediante compensación funcional, es decir, que los individuos tienen la mutación patológica pero que compensan este defecto produciendo más mitocondrias y de esta forma, sobreviven a la mutación patológica y la transmiten a la descendencia. De esta forma se da tiempo a que aparezca una mutación compensatoria (Moreno-Loshuertos et al, 2011) Por otra parte, 6 millones de años parece mucho tiempo para que sobreviva la mutación ya que además hay que tener en cuenta que en este caso se trata de una mutación patológica homoplásmica por lo que todas las mitocondrias albergarán el mismo defecto.

Otra posible explicación sería que la posible mutación compensatoria MRPS12:R68L que hemos encontrado sea una mutación que otorga resistencia contra los aminoglicósidos. Si este fuera el caso, podría ser que, debido a la ausencia previa de aminoglicósidos como factor ambiental, la mutación compensatoria hubiese desaparecido por selección negativa previamente a la aparición de la mutación patológica; pues a veces una mutación compensatoria de este tipo sacrifica parte de la velocidad de síntesis proteica a cambio de una mayor fidelidad en la lectura del código genético (Agarwal et al, 2011) pero, en la ausencia de aminoglicósidos en el medio, la mutación compensatoria tiene un efecto negativo para la supervivencia.

También podría que esta mutación requiera de factores ambientales como los aminoglicósidos para la obtención de la máxima expresividad de dicha enfermedad. Esto haría que los aminoglicósidos sean los factores que inciten a la adquisición de mutaciones compensatorias.

Basándonos en la última suposición, la mutación MRPS12:68L no sería una mutación compensatoria debido a que la aparición de los aminoglicósidos es un factor muy reciente. Esto explicaría que las células COS-1 (que poseen la mutación m.1949C>T pero no MRPS12:68L) resistan a medios con aminoglicósidos mediante por ejemplo, otro tipo de mutación compensatoria aunque esto último no se pudo confirmar debido a que las células COS-1 están posiblemente immortalizadas con un vector de selección de resistencia a aminoglicósidos.

### **4.3 MRPs como mutaciones compensatorias de otras mutaciones patológicas en el mt-rRNA**

Independientemente del escenario empleado para la supervivencia de la mutación, se sabe que la evolución de las MRPs es mayor que en las proteínas ribosomales citosólicas (MRC) de tal forma que les permite adaptarse a la mayor velocidad de mutación del mtDNA codificante de mt-rRNA en comparación con el nDNA a pesar de que ambas MRP y MRC son codificadas en el nDNA (Pietromonaco et al, 1986). Casos similares ocurren con los aminoacil-tRNAs sintetasas codificadas en el núcleo pero con función mitocondrial (Frenkel-Morgenstern et al, 2009) o con las subunidades ribosomales de los complejos OXPHOS codificadas en el núcleo (Osada et al, 2011). Estos mecanismos tratan de evitar que disminuya la velocidad de la traducción de subunidades OXPHOS en los ribosomas mitocondriales o que no haya ensamblaje entre las subunidades codificadas por el mtDNA y el nDNA. Esto hace pensar que es factible que numerosas mutaciones compensatorias que afectan a la región mt-rRNA aparezcan en la región del nDNA codificante de MRPs. Por ello consideramos que merece la pena realizar un profundo estudio de estas proteínas para la búsqueda de nuevas mutaciones compensatorias, las cuales podrían compensar otros defectos relacionados con los ribosomas mitocondriales y la síntesis de subunidades del sistema OXPHOS. Además, la evolución y la creciente información que se encuentra en las bases de datos acerca de las diferentes estructuras proteicas que interaccionan con el mt-rRNA simplifican esta búsqueda. De esta forma, se ha podido ver que la proteína MRPS12 puede jugar un papel muy importante en la mutación homoplásmica m.1494C>T.

La respuesta al hecho de que la mutación solo afecta a un tejido específico (células ciliares) puede yacer en la existencia de distintas isoformas de la MRPS12, pues la existencia de otras MRP isoformas ya ha sido descrita (Spirina et al, 2000) o a que otros factores como distintos receptores de membrana captadores de drogas estén involucrados (SvenN. Hobbie et al, 2008 a).

## 5 Conclusiones

---

1. Utilizando aproximaciones evolutivas hemos encontrado que la mutación m.1494C>T está fijada en la familia de primates Cercopithecoidea. Al ser un nucleótido importante para la función del 12SrRNA cuyo mal funcionamiento puede desencadenar un fenotipo patológico, esta mutación debe estar compensada.
2. El gen nuclear codificante de MRPS12 es un posible candidato a ser una mutación compensatoria. Además, hemos visto que el aminoácido 68 se encuentra muy cerca de la posición 1494 por lo que los distintos polimorfismos pueden jugar un papel muy importante.
3. Hemos generado líneas celulares sobreexpresando las variantes de la proteína MRPS12 humana y de macaco para poder estudiar el efecto de la mutación a nivel bioquímico y la distinta respuesta de estas líneas celulares cuando se exponen a aminoglicósidos.

## 6 Agradecimientos

---

Este proyecto se ha llevado a cabo gracias a los profesores Eduardo Ruiz Pesini y María Pilar Bayona Bafaluy, quienes muy amablemente se han tomado la molestia de ir enseñándome las variadas técnicas bioquímicas empleadas en laboratorios de biotecnología además de orientarme y supervisar este trabajo. También me gustaría agradecer al resto del grupo de GENOXPHOS: Nuria Garrido Pérez, Raquel Moreno Loshuertos, Patricia Meade Huerta, Patricio Fernández-Silva y Amaya López Pascual la ayuda en varios momentos durante el desarrollo de este master.

## 7 Bibliografía

---

- (1) Agarwal D, Gregory ST, O'Connor M. Error-prone and error-restrictive mutations affecting ribosomal protein S12. *J Mol Biol* 2011 Jul 1;410(1):1-9.
- (2) Azevedo L, Carneiro J, van Asch B, Moleirinho A, Pereira F, Amorim A. Epistatic interactions modulate the evolution of mammalian mitochondrial respiratory complex components. *BMC Genomics* 2009 Jun 13;10:266-2164-10-266.
- (3) Bindu LH, Reddy PP. Genetics of aminoglycoside-induced and prelingual non-syndromic mitochondrial hearing impairment: a review. *Int J Audiol* 2008 Nov;47(11):702-707.
- (4) Carelli V, Giordano C, d'Amati G. Pathogenic expression of homoplasmic mtDNA mutations needs a complex nuclear-mitochondrial interaction. *Trends Genet* 2003 May;19(5):257-262.
- (5) Cavdar Koc E, Burkhardt W, Blackburn K, Moseley A, Spemulli LL. The small subunit of the mammalian mitochondrial ribosome. Identification of the full complement of ribosomal proteins present. *J Biol Chem* 2001 Jun 1;276(22):19363-19374.
- (6) del Castillo FJ, Rodriguez-Ballesteros M, Martin Y, Arellano B, Gallo-Teran J, Morales-Angulo C, et al. Heteroplasmy for the 1555A>G mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene in six Spanish families with non-syndromic hearing loss. *J Med Genet* 2003 Aug;40(8):632-636.
- (7) DePristo MA, Weinreich DM, Hartl DL. Missense meanderings in sequence space: a biophysical view of protein evolution. *Nat Rev Genet* 2005 Sep;6(9):678-687.
- (8) Ding Y, Leng J, Fan F, Xia B, Xu P. The Role of Mitochondrial DNA Mutations in Hearing Loss. *Biochem Genet* 2013 Apr 21.
- (9) Frenkel-Morgenstern M, Tworowski D, Klipcan L, Safro M. Intra-protein compensatory mutations analysis highlights the tRNA recognition regions in aminoacyl-tRNA synthetases. *J Biomol Struct Dyn* 2009 Oct;27(2):115-126.



- (10) Hobbie SN, Akshay S, Kalapala SK, Bruell CM, Shcherbakov D, Bottger EC. Genetic analysis of interactions with eukaryotic rRNA identify the mitoribosome as target in aminoglycoside ototoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 a Dec 30;105(52):20888-20893.
- (11) Hobbie SN, Bruell CM, Akshay S, Kalapala SK, Shcherbakov D, Bottger EC. Mitochondrial deafness alleles confer misreading of the genetic code. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 b Mar 4;105(9):3244-3249.
- (12) Kondrashov AS, Sunyaev S, Kondrashov FA. Dobzhansky-Muller incompatibilities in protein evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 Nov 12;99(23):14878-14883.
- (13) Li R, Greinwald JH, Jr, Yang L, Choo DI, Wenstrup RJ, Guan MX. Molecular analysis of the mitochondrial 12S rRNA and tRNA<sup>Ser</sup>(UCN) genes in paediatric subjects with non-syndromic hearing loss. *J Med Genet* 2004 Aug;41(8):615-620.
- (14) Maisnier-Patin S, Paulander W, Pennhag A, Andersson DI. Compensatory evolution reveals functional interactions between ribosomal proteins S12, L14 and L19. *J Mol Biol* 2007 Feb 9;366(1):207-215.
- (15) Mitchell P, Moyle J. Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation. *Nature* 1967 Jan 14;213(5072):137-139.
- (16) Montoya J. Biogénesis y Patología Mitocondrial. 2005;60(Rev. Real Academia de Ciencias. Zaragoza):7-28.
- (17) Moreno-Loshuertos R, Ferrin G, Acin-Perez R, Gallardo ME, Viscomi C, Perez-Martos A, et al. Evolution meets disease: penetrance and functional epistasis of mitochondrial tRNA mutations. *PLoS Genet* 2011 Apr;7(4):e1001379.
- (18) O'Connor M, De Stasio EA, Dahlberg AE. Interaction between 16S ribosomal RNA and ribosomal protein S12: differential effects of paromomycin and streptomycin. *Biochimie* 1991 Dec;73(12):1493-1500.
- (19) Ogle JM, Murphy FV, Tarry MJ, Ramakrishnan V. Selection of tRNA by the ribosome requires a transition from an open to a closed form. *Cell* 2002 Nov 27;111(5):721-732.

- (20) Osada N, Akashi H. Mitochondrial-nuclear interactions and accelerated compensatory evolution: evidence from the primate cytochrome C oxidase complex. *Mol Biol Evol* 2012 Jan;29(1):337-346.
- (21) Pacheu-Grau D, Gomez-Duran A, Lopez-Gallardo E, Pinos T, Andreu AL, Lopez-Perez MJ, et al. 'Progress' renders detrimental an ancient mitochondrial DNA genetic variant. *Hum Mol Genet* 2011 Nov 1;20(21):4224-4231.
- (22) Pacheu-Grau D, Gomez-Duran A, Lopez-Perez MJ, Montoya J, Ruiz-Pesini E. Mitochondrial pharmacogenomics: barcode for antibiotic therapy. *Drug Discov Today* 2010 a Jan;15(1-2):33-39.
- (23) Pacheu-Grau D, Gomez-Duran A, Montoya J, Ruiz-Pesini E. Influence of mtDNA genetic variation on antibiotic therapy. *Pharmacogenomics* 2010 b Sep;11(9):1185-1187.
- (24) Perelman P, Johnson WE, Roos C, Seuanez HN, Horvath JE, Moreira MA, et al. A molecular phylogeny of living primates. *PLoS Genet* 2011 Mar;7(3):e1001342.
- (25) Pietromonaco SF, Hessler RA, O'Brien TW. Evolution of proteins in mammalian cytoplasmic and mitochondrial ribosomes. *J Mol Evol* 1986;24(1-2):110-117.
- (26) Rodriguez-Ballesteros M, Olarte M, Aguirre LA, Galan F, Galan R, Vallejo LA, et al. Molecular and clinical characterisation of three Spanish families with maternally inherited non-syndromic hearing loss caused by the 1494C->T mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene. *J Med Genet* 2006 Nov;43(11):e54.
- (27) Russo A, Cirulli C, Amoresano A, Pucci P, Pietropaolo C, Russo G. cis-acting sequences and trans-acting factors in the localization of mRNA for mitochondrial ribosomal proteins. *Biochim Biophys Acta* 2008 Dec;1779(12):820-829.
- (28) Shah ZH, Toompuu M, Hakkinen T, Rovio AT, van Ravenswaay C, De Leenheer EM, et al. Novel coding-region polymorphisms in mitochondrial seryl-tRNA synthetase (SARSM) and mitoribosomal protein S12 (RPMS12) genes in DFNA4 autosomal dominant deafness families. *Hum Mutat* 2001 May;17(5):433-434.

- (29) Spirina O, Bykhovskaya Y, Kajava AV, O'Brien TW, Nierlich DP, Mougey EB, et al. Heart-specific splice-variant of a human mitochondrial ribosomal protein (mRNA processing; tissue specific splicing). *Gene* 2000 Dec 31;261(2):229-234.
- (30) Sylvester JE, Fischel-Ghodsian N, Mougey EB, O'Brien TW. Mitochondrial ribosomal proteins: candidate genes for mitochondrial disease. *Genet Med* 2004 Mar-Apr;6(2):73-80.
- (31) Vila-Sanjurjo A, Lu Y, Aragonez JL, Starkweather RE, Sasikumar M, O'Connor M. Modulation of 16S rRNA function by ribosomal protein S12. *Biochim Biophys Acta* 2007 Jul-Aug;1769(7-8):462-471.
- (32) Wallace DC. Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease. 1994;91:8739-8746.
- (33) Wei Q, Xu D, Chen Z, Li H, Lu Y, Liu C, et al. Maternally transmitted aminoglycoside-induced and non-syndromic hearing loss caused by the 1494C > T mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene in two Chinese families. *Int J Audiol* 2013 Feb;52(2):98-103.
- (34) Zhao H, Li R, Wang Q, Yan Q, Deng JH, Han D, et al. Maternally inherited aminoglycoside-induced and nonsyndromic deafness is associated with the novel C1494T mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene in a large Chinese family. *Am J Hum Genet* 2004 Jan;74(1):139-152.
- (35) Zhao H, Young WY, Yan Q, Li R, Cao J, Wang Q, et al. Functional characterization of the mitochondrial 12S rRNA C1494T mutation associated with aminoglycoside-induced and non-syndromic hearing loss. *Nucleic Acids Res* 2005 Feb 18;33(3):1132-1139.